

p. 99  
N° 1—3 B II

JANVIER—MARS

1938

BULLETIN INTERNATIONAL  
DE L'ACADÉMIE POLONAISE  
DES SCIENCES ET DES LETTRES

CLASSE DES SCIENCES MATHÉMATIQUES ET NATURELLES  
SÉRIE B: SCIENCES NATURELLES (II)

CRACOVIE  
IMPRIMERIE DE L'UNIVERSITÉ  
1938



Publié, par l'Académie Polonaise des Sciences et des Lettres, sous la direction  
de **M. S. Maziarski**, Secrétaire de la Classe des Sciences Mathématiques et  
Naturelles (Cracovie, Institut d'Histologie de l'Université, rue Wielopole 15).

Nakładem Polskiej Akademii Umiejętności.  
Drukarnia Uniwersytetu Jagiellońskiego pod zarządem Józefa Filipowskiego

BULLETIN INTERNATIONAL  
DE L'ACADÉMIE POLONAISE  
DES SCIENCES ET DES LETTRES

CLASSE DES SCIENCES MATHÉMATIQUES ET NATURELLES  
SÉRIE B: SCIENCES NATURELLES (II)

ANNÉE 1938

CRACOVIE  
IMPRIMERIE DE L'UNIVERSITÉ  
1939



## Table des matières.

	Page
<b>J. Ackermann:</b> Experimentelle histo-chemische Untersuchungen über den Lezithinstoffwechsel im Tierkörper. II. Teil. Über den Einfluß der Lezithinverfütterung auf den Lipidgehalt der Leber (Planche 1) . . . . .	1
<b>J. S. Mikulski:</b> Experimental studies in thermal ecology of developing eggs of some amphibians ( <i>Rana</i> , <i>Bufo</i> , <i>Pelobates</i> ) . . . . .	23
<b>S. Skowron und Z. Wiciński:</b> Über die Lebensdauer der gelben Körper und die sie beeinflussenden Faktoren . . . . .	47
<b>Z. Grodziński and J. Marchlewski:</b> The Influence of the Serum upon the Motility of Spermatozoa of the Domestic Cock . . . . .	55
<b>M. Hans und Z. Tabencka:</b> Über die Blutgefäße der Haut von <i>Myxine glutinosa</i> L. . . . .	69
<b>H. Szarski:</b> Corpus lymphaticum subdermale in the frogs: <i>Rana esculenta</i> , <i>R. temporaria</i> and <i>R. terrestris</i> (Planche 2) . . . . .	79
<b>R. Skrochowska:</b> Über die Abhängigkeit der Gewöhnung bei Vorticellen von der Frequenz wiederholter Reize . . . . .	89
<b>L. Monné:</b> Über polychrome Vitalfärbungen verschiedener Gastropoden-Zellen mit Pyroninen . . . . .	109
<b>Zb. Główczyński:</b> Sur la teneur en vitamine A de la graine d'Alpiste ( <i>Phalaris canariensis</i> ) (Planche 3) . . . . .	115
<b>S. Skowron:</b> Untersuchungen über das endokrine System des Igels ( <i>Erinaceus</i> ). I. Histologische Veränderungen in den Hoden und in den akzessorischen Drüsen des männlichen Genitalapparates, die periodisch oder unter dem Einfluß von endokrinen Reizen auftreten (Planche 4) . . . . .	129
<b>R. J. Wojtusiak und B. Ferens:</b> Untersuchungen über die Orientation und Geschwindigkeit des Fluges bei Vögeln. IV. Heimkehrgeschwindigkeit und Orientierungsart bei den Rauchschnalben ( <i>Hirundo rustica</i> L.) . . . . .	173
<b>B. Jałowy:</b> Über die heterogene Regeneration von Nervenendigungen in den Tasthaaren (Planche 5) . . . . .	203
<b>M. Monné:</b> Vital staining experiments on <i>Amoeba proteus</i> and <i>A. dubia</i>	221
<b>J. Ackermann:</b> Histochemische Untersuchungen über den Gehalt an Lipiden und Karotenoiden im Darm des überwinterten Frosches	241

	Page
<b>J. Biborski:</b> Über den histologischen Bau der Venen des Dorsches ( <i>Gadus callarias</i> L., syn.: <i>G. Morrhu</i> a L.) . . . . .	285
<b>F. Pautsch:</b> Die Bedeutung von Nervenrohr und Chorda dorsalis für die Entwicklung des Schwanzes der Larve des Grasfrosches ( <i>Rana temporaria</i> ) . . . . .	301
<b>H. Szarski:</b> The Blood Vessels of the Thymus Gland in some of the <i>Urodela</i> . . . . .	305
<b>Z. Grodziński:</b> Zur Morphologie des Hühnereidotter unter normalen und experimentellen Bedingungen (Planches 6—8) . . . . .	317
<b>Z. Szarski:</b> The Results of the Thymus Gland Extirpation in <i>Salientia</i>	357

**BULLETIN INTERNATIONAL**  
**DE L'ACADÉMIE POLONAISE DES SCIENCES ET DES LETTRES**  
**CLASSE DES SCIENCES MATHÉMATIQUES ET NATURELLES**  
**SÉRIE B: SCIENCES NATURELLES (II)**

1938

---

*Doświadczalne badania histochemiczne nad przemianą  
lecytyny w ustroju zwierzęcym. II. cz. O wpływie kar-  
mienia lecytyną na zawartość lipidową wątroby. — Expe-  
rimentelle histo-chemische Untersuchungen über den Lezi-  
thinstoffwechsel im Tierkörper. II. Teil. Über den Einfluß  
der Lezithinverfütterung auf den Lipidgehalt der Leber.*

Mémoire

de M<sup>lle</sup> **J. ACKERMANN,**

présenté le 10 Janvier 1938 par MM. L. Marchlewski m. t. et S. Maziarski m. t.

(Planche 1).

Die vorliegende Arbeit ist eine Fortsetzung der Untersuchungen über den Lezithinstoffwechsel im Tierkörper, deren erster Teil schon publiziert wurde (Ackermann 1). In der zitierten Arbeit werden die Ergebnisse der Untersuchungen über den Darm dieser Frösche angeführt, welche mit gereinigtem Lezithin gefüttert worden sind. In diesem Falle erscheinen in der Darmwand des Frosches, vor allem im Darmepithel, Neutralfette, welche auf den histologischen Präparaten als Resorptionsprodukt auftreten. Die chemischen Untersuchungen weisen darauf hin, daß sich die Menge der Neutralfette in der Darmwand nach der einmaligen Verfütterung des Tieres mit Lezithin zwei- bis fünfmal vermehrt, im Verhältnis zum Gehalt dieser Verbindungen bei den Kontrolltieren. Der Prozentsatz der Phosphorolipide vergrößert sich unter solchen Verhältnissen nicht. Hieraus ergibt sich der Schluß, daß die resorbierten Produkte des hydrolytischen Zerfalls des Lezithins in der Darmwand nicht resynthetisiert werden. In der Folge wollte ich mich überzeugen, ob die Lezithinverfütterung den Phosphatidgehalt anderer Organe trotzdem nicht beeinflußt. Da,

wie festgestellt wurde, in der Darmwand die Resynthese des Lezithins nicht zustande kommt, so ist es nicht ausgeschlossen, daß sich die resorbierten Produkte der Hydrolyse, auf ihren eigenen Wegen durch den Tierorganismus wandernd, in je einem Organ, in ihrer ursprünglichen Gestalt, ablagerten. Hier fällt uns vor allem die Leber ein, denn erstens stellt sie den Knotenpunkt des allgemeinen Stoffwechsels dar, zweitens nimmt sie im Metabolismus der Lipide eine spezielle Stelle ein als Ort der vermutlichen Synthese der Phosphatide, der Desaturation von Fettsäuren und ähnlicher wichtiger biochemischer Prozesse in dieser Klasse von Verbindungen.

In den Anfangsuntersuchungen über den Organismus des Frosches müssen die spezifischen Lebensbedingungen, welche den Aufbau und die Tätigkeit seiner Organe beeinflussen, beachtet werden. Speziell charakteristisch scheint in dieser Hinsicht die Leber zu sein. Samt dem ganzen Organismus unterliegt sie periodischen Veränderungen, welche schon makroskopisch in der Verschiedenheit der Größe, Farbe und Konsistenz zum Ausdruck kommen. Dieser Rhythmus des Froschorganismus scheint den Jahreszeiten und den mit ihnen zusammenhängenden Differenzen in den Lebensbedingungen unterworfen zu sein. Nach Gaupp (19), welcher in seiner Monographie zahlreiche Arbeiten über dieses Thema erwähnt, ist die Ursache für die Veränderungen in der Leber während der einjährigen Lebensperiode des Frosches gar nicht bekannt. A. Leonard (21) schreibt der Leber eine Periode des Wachstums (vom Frühling bis zum November) und eine Periode des Verbrauches (vom Dezember bis zum Frühling) zu. Den Höhepunkt wurde also ihre Entwicklung im November erreichen (in Zürich!): das Organ ist groß und besitzt ebenso große mit Fett, Glykogen und Eiweißvorräten angefüllte Zellen. Der Höhepunkt des Verbrauches fällt in den April: die Leber ist klein, die Zellen sind auch kleiner geworden und fettarm, was eine Folge der fortwährenden Abnahme der ehemaligen Anfüllung ist. Letzteres ist mit der Beobachtung schwer in Einklang zu bringen, weil nach Langley (20) das Maximum des Fettgehaltes in den Monaten Februar und März, also an das Ende der winterlichen Hungerperiode fällt, das Minimum dagegen wird im Oktober und November beobachtet. Dem genannten Verfasser zufolge entscheidet die Temperatur über die Unterschiede im physiologischen Zustande

der Leber während der Jahreszeiten. Im Winter kann man leicht das Schwinden des Fettes samt dem Glykogen in der Leber hervorzurufen, wenn man das Tier in die Wärme bringt.

In der neueren Literatur findet dieses Problem im Bezug auf den Salamander in dem Sinne Aufklärung, daß im Frühling tatsächlich in der Leber dieses Tieres die sog. sekundäre Fettimpletion beobachtet wird, ein Prozeß, welcher mit dem Laichgeschäft im Zusammenhang steht; die Lipide dürften nach der Verfettung der Skelettmuskulatur in die Leber wandern (Berg 4, 5, 6).

Für mich hatte die Feststellung der Bedingungen der Leberfunktionen und des mit den letzteren verbundenen mikroskopischen Bildes eine wichtige Bedeutung, weil ich die Teilnahme der Leber an dem Lezithinstoffwechsel untersuchen wollte und zu dem Zwecke alle physiologischen Einflüsse, welche den Lauf der Tätigkeit des Organes verändern oder hemmen, ausschließen mußte. Für meine Experimente wählte ich die Sommerzeit, nämlich den Monat Juli—Anfang August erstens weil die Mitte des Sommers am besten dem Höhepunkt der Assimilationstätigkeiten entspricht, also der Leistungsfähigkeit der Resorption und weil um diese Zeit die Nahrungsstoffe in den Organismus leicht geleitet werden und zweitens, weil die vorliegende Arbeit eine Fortsetzung der Experimente über die Resorption des Lezithins im Darm ist (Ackerman l. c.) und jene Untersuchungen bewiesen, daß die Ende Juni und im Juli unternommenen Versuche distinkteste Ergebnisse in morphologischer und chemischer Hinsicht ergaben.

Als Versuchstiere dienten Wasserfrösche, welche in einem Teich der großen Fischwirtschaft gefangen worden waren und wahrscheinlich einheitliche Futterverhältnisse hatten. Um möglichst denselben Gehalt der Lipide in der Leber zu gewinnen, wurden die Tiere vor der Fütterung mit Lezithin ausgehungert.

Ich hatte folgenden Arbeitsplan: Zuallererst mußte ich durch Kontrollbestimmungen die Ergebnisse über den Gehalt der einzelnen Lipide der Leber von ausgehungerten Fröschen gewinnen. Gleichzeitig mußte ich die histologischen Präparate aus denselben Organen verfertigen um mir das morphologische Bild der Leber während der Hungerperiode, mit spezieller Berücksichtigung der Lipide, zu schaffen. Dann mußte ich nacheinander einige Frösche mit gereinigtem Lezithin füttern und nachdem sie getötet wurden,

den Gehalt der einzelnen Lipide in der Leber bestimmen, um einen Vergleich mit den Ergebnissen der Kontrollversuche ziehen zu können; gleichzeitig mußte ich in den histologischen Präparaten nach eventuellen morphologischen Veränderungen suchen, welche bei den Experimenten vorkommen konnten.

### Methode und chemische Ergebnisse.

Die zu den Versuchen angewandten Wasserfrösche, die in verschiedenen Zeiträumen ausgehungert wurden (siehe Tabellen), wurden durch Dekapitation getötet. In einer experimentellen Arbeit über die Leber (Beeston, Channon, Wilkinson 7) wird erwähnt, daß die Tiere (Ratten) guillotiniert wurden, um ein Ausfließen des Blutes aus dem Organismus zu verursachen, damit der Blutgehalt in den Lebern der einzelnen Individuen möglichst vereinheitlicht werde. Die Dekapitation des Frosches durch einen entsprechend tiefen Stich bewirkt eine gewaltige Ausströmung des Blutes so, daß die Bedingung des Blutausfließens vor der Entnahme der Leber als erfüllt angesehen werden kann.

Die Leber wurde aus der Bauchhöhle mit entfetteten Instrumenten und mit besonderer Vorsicht entnommen, damit die Gallenblase nicht verletzt werde, und teils zur histologischen Fixierung, teils, in einer Menge von 0·2—0·5 g zu chemischen Untersuchungen bestimmt.

Die Ausführung der analytischen Methode wurde in meiner methodischen Arbeit genau beschrieben (Ackermann 2). Im Gange der Untersuchungen über die Leber kamen die in der zitierten Arbeit erwähnten Schwierigkeiten bei der Bestimmung des Gesamtcholesterols nicht vor. Die dort beschriebene Methode der Lipidbestimmung wurde in vollem Ausmaße auch hier angewandt. Der einzige Unterschied beruhte darin, daß die Extraktionszeit des mit analytischem Seesand zerriebenen Organes (mittels Alkohol-Äthergemisch) auf eine Stunde gekürzt wurde. Dies ermöglicht uns die ganze Bestimmung samt der Titration in einem Tage durchzuführen.

Ca 0·3—0·5 g gereinigten Lezithins, in Gestalt einer dichten, wässrigen Emulsion, wurde mit einer Pipette in den Froschmagen eingeführt. Das Lezithin enthielt nach Verfertigung aus Eigelb und nach einer sorgfältigen Reinigung ca 97% reiner

Substanz. Die Verunreinigungen waren Cholesterolsuren (Digintoninreaktion). Die Frösche wurden größtenteils einmal, öfters aber auch mehrmals gefüttert; getötet wurden sie 15 Stunden nach der letzten Verfütterung.

Die Ergebnisse des Hungers der Kontrolltiere (Tabelle I, No 1—5) bestätigen, daß sich der Phosphatidenlevel fast ohne Veränderung hält, was übrigens ihrer Rolle als beständiges Element, »élément constant« von Terroine, gut entspricht.

Ähnlich weist auch das freie Cholesterol eine weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse auf.

Der Gehalt an Glyzeriden fällt schnell mit den Fortschritten des Hungerns, viel langsamer geschieht es dagegen bei den Cholesterolestern.

TABELLE I.

No	Geschlecht	Datum	Hungertage	% Phosphatide	% Cholesterolfrei	% Cholesterolester	% Neutralfette	% Gesamtlipide
Kontrolltiere:								
1.	♀	4. 7. 37	11	—	—	—	—	—
2.	♀	6. 7. 37	13	1·97	0·28	1·39	1·11	4·75
3.	♀	8. 7. 37	15	1·67	0·38	0·86	0·49	3·40
4.	♀	10. 7. 37	17	1·88	0·28	0·40	0·32	2·88
5.	♀	14. 7. 37	21	2·14	0·34	0·96	0·54	3·98
Mittelwert				<b>1·91</b>	<b>0·32</b>	<b>0·90</b>	<b>0·61</b>	<b>3·75</b>
Versuchstiere:								
6.	♀	20. 7. 37	26	1·46	0·39	0·15	1·06	3·06
7.	♀	21. 7. 37	27	1·91	0·56	0·26	0·64	3·37
8.	♀	23. 7. 37	30	2·06	0·35	1·12	0·79	4·32
13.	♀	30. 7. 37	37	1·86	0·79	0·26	0·49	3·40
Mittelwert				<b>1·82</b>	<b>0·52</b>	<b>0·45</b>	<b>0·74</b>	<b>3·53</b>

Die Ergebnisse der einmaligen Verfütterung des Tieres mit Lezithin sind ebenfalls auf Tabelle I dargestellt. Es ist ersichtlich, daß der Gehalt an Phosphatiden der Leber der gefütterten Tiere gar nicht anwächst, er ist sogar (um 0·09%) geringer. Der Gehalt an freiem Cholesterol hebt sich um 0·20%, ähnliches beobachten wir bei Neutralfetten, nämlich eine Vergrößerung um 0·13%. Der bedeutende Fall des Prozentsatzes der Cholesterinester steht bei den drei Tieren (No 6, 7, 13) in auffälliger Disproportion zu den Ergebnissen bei No 8.

Die oben dargestellten Versuchsergebnisse scheinen im Vergleich mit den unzweifelhaften Resultaten meiner Untersuchungen über den Darm ganz merkwürdig zu sein. Wenn, infolge der Lezithinverfütterung, die Menge der Neutralfette in der Darmwand sich so distinkt vergrößert (Ackermann 1), so fällt es schwer zu vermuten, daß die relativ große Menge der entstandenen Glyceride in den allgemeinen Kreislauf gelange und keinen Einfluß auf den Lipidgehalt der Leber ausübe, um so mehr, da gerade das letztere Organ eine große Tendenz zur Anhäufung der Fette in der Versuchsperiode aufweist.

Im weiteren Verlaufe der Arbeit wurde die Fütterungsmenge vergrößert, weil wir uns überzeugen wollten, ob durch mehrmalige Lieferungen des Lezithins der Phosphatidlevel der Leber nicht beeinflußt werde oder ob die Neutralfette dort nicht abgelagert würden. Die Frösche wurden zwei- und viermal in 15-stündigen Abständen gefüttert. Da eines von den Versuchstieren ein Männchen war, wurden an einem anderen Männchen Kontrollbestimmungen unternommen, um uns zu orientieren, ob unter den Männchen und Weibchen keine Differenzen im Lipidgehalt der Leber vorkommen. Zu demselben Zweck wurde das dritte Männchen mit Lezithin nur einmal gefüttert. Die Ergebnisse dieser Versuche sind auf Tabelle II sichtbar. Wir sehen, daß eine mehrmalige Fütterung mit Lezithin die Phosphatidmenge des Organs weder beim Weibchen noch beim Männchen vergrößert. Der Neutralfettlevel ist beim Weibchen, welches viermal gefüttert wurde, niedriger oder gleich dem Neutralfettgehalt nach einer einmaligen Fütterung und bei den Männchen auffallend niedriger als bei den Weibchen. Der mittlere Gehalt beträgt bei gefütterten Weibchen 0·74%, bei den Kontrolltieren 0·64% und beim Kontrollmännchen 0·35%, beim gefütterten dagegen 0·26%. Unsere Aufmerksam-

keit erregt der niedrige Prozentsatz oder das Fehlen der Cholesterolester bei den Männchen.

TABELLE II.

No	Geschlecht	Fütterung mit Lezithin	Datum	Hungertage	% Phosphatide	% Cholesterol frei	% Cholesterolester	% Neutralfette	% Gesamtlipide
9.	♀	2 mal	24. 7. 37	31	1·85	0·38	—	—	—
10.	♀	4 mal	26. 7. 37	33	1·82	0·18	0·82	0·52	3·34
11.	♂	4 mal	28. 7. 37	35	2·05	0·49	0·18	0·26	2·98
12.	♂	1 mal	29. 7. 37	36	1·63	0·53	0·00	0·26	2·42
14.	♂	—	3. 8. 37	41	1·63	0·77	0·00	0·35	2·75
15.	♀	3 mal 1 mal	4. 8. 37	33 und 42	—	0·63	1·93	1·55	—

Einen speziellen Fall stellt der Frosch No 15 dar. Es war ein großes Weibchen, welches nach 33-tägigem Fasten dreimal mit Lezithin gefüttert wurde und dann, nach 9-tägiger Pause, wieder einmal gefüttert und getötet wurde. Wir besitzen keine Bestimmung für die Phosphatide, weil das Kölbchen zerbrach, aber die Ergebnisse sind für Cholesteride und Glizeride überraschend hoch. Vielleicht kommt hier der Fall einer individuellen Abweichung von der Norm vor, um so mehr, da auch das histologische Bild different von den anderen aussieht (siehe histologischen Teil). Wie aus den Tabellen I und II ersichtlich ist, schwankte die Zeit des Hungers in weiten Grenzen, nämlich zwischen 11—42 Tagen. Da das histologische Aussehen der Leber der ausgehungerten Frösche sich auffallend mit dem andauernden Hungern veränderte und das charakteristische Merkmal der Veränderungen das verminderte Volumen der Zellen des Organes war, habe ich mich entschlossen, diese Versuche auch an solchen Tieren zu wiederholen, welche nur eine kurze Zeit hindurch gehungert hatten, und deren Leber keine Veränderungen aufwies. Diese Tiere (ein Weibchen und ein Männchen) wurden nach einer kurzen Hungerperiode einmal mit Lezithin gefüttert. Die Ergebnisse der betreffenden Versuche sind auf Tabelle III ersichtlich. Die Fütterung

TABELLE III.

No	Geschlecht	Fütterung mit Lezithin	Datum	Hungertage	% Phosphatide	% Cholesterol frei	% Cholesterolester	% Neutralfette	% Gesamtlipide
16.	♀	—	5. 8. 37	6	1·56	0·00	0·71	4·06	6·33
17.	♀	1 mal	8. 8. 37	9	1·76	0·47	0·74	4·78	7·75
18.	♂	—	9. 8. 37	4	2·33	0·26	0·41	1·25	4·25
19.	♂	1 mal	10. 8. 37	10	1·43	0·20	0·19	0·18	2·00

mit Lezithin ruft keine Vergrößerung der Phosphatidenmenge und der Neutralfette in der Froschleber hervor. Der Prozentgehalt an Phosphatiden beträgt 1·56% beim Kontrollfrosche und 1·76% beim Versuchsfrosche, was als annähernder Wert gelten kann; die Differenz ist hier also eine individuelle Schwankung (vergleiche Tabelle I). Ähnlich dürfte auch der Gehalt an Glizeriden bei beiden Tieren interpretiert werden. Der Gehalt an Lipiden in der Leber des Kontrollmännchens wurde am 4. Hungertage bestimmt. Der Prozentsatz der Glizeride ist auffallend; er ist viermal niedriger als derjenige beim Weibchen nach einem 6-tägigen Hungern. Bei Männchen beobachten wir nach 10-tägigem Hungern einen enormen Fall des Glizeridgehaltes trotz der Fütterung mit Lezithin, ein Umstand, welcher dem Hungerprozeß zugeschrieben werden muß.

An Hand meiner Versuche muß ich feststellen, daß durch Fütterung mit Lezithin weder der Phosphatidlevel der Leber steigt, noch die Glizeride in derselben erscheinen.

Außerdem fällt noch eine Tatsache auf, welche den differenten Level der Lipide in der Leber des Weibchens und des Männchens betrifft. Der Gehalt an Cholesterol- und Glizerolestern ist in allen Bestimmungen bedeutend höher in der Leber des Weibchens als in derjenigen des Männchens. Bei den Weibchen beträgt der Prozentsatz der Cholesterolester 1·39%—0·26%, bei den Männchen 0·45%—0·0%, derjenige der Glizeride bei den Weibchen 4·78%—0·32%, bei den Männchen 1·25%—0·18%. Das, was man den allgemeinen »Lipidgehalt« der Leber nennen könnte, ist bei den Weibchen größer als bei den Männchen. Diese Beob-

achtungen sind geeinet, den Gegenstand einer besonderen Arbeit zu bilden.

### **Histologische Methoden und Beschreibung der histologischen Präparate.**

Die Leberstücke jedes einzelnen Tieres wurden in 10% Formol und in der Fixierungsflüssigkeit von Regaud fixiert. Die in Formol fixierten Stücke wurden nach 24 Stunden auf dem Gefriermikrotom in 10  $\mu$  dicke Schnitte zerlegt. Dieselben wurden teils mit Sudan-Orange auf Lipide gefärbt und mit saurem Hämalum nachgefärbt, teils wurden sie in ungefärbtem Zustande in Gummi arabicum montiert, um den Beweis für das Vorhandensein und die Lokalisation von nativen Farbstoffen (Melanin und Karotenoide) zu erbringen.

Die in der Regaud'schen Flüssigkeit fixierten und chromierten Leberstücke durchtränkte ich mit Paraffin und die daraus verfertigten Serienschnitte wurden mit Eisen-Hämatoxylin nach der Regaud-Methode auf Mitochondrien gefärbt.

Die Froschleber ist aus verästelten Kanälen zusammengesetzt, welche durch große Dimensionen der sie umgebenden Zellen charakteristisch sind und mit einem sehr engen Lumen des Schlauches versehen sind. Die genannten Kanäle sind miteinander netzartig verbunden. Unter den letzteren befinden sich sehr reiche Kapillaren, an welche die Zellen mit dem größeren Teile ihrer Oberfläche anliegen. In diesen Blutgefäßen kommen in manchen Tätigkeitsperioden manchmal Lipide vor, nicht nur in den Endothelien, sondern auch im Gefäßlumen (Berg l. c.). Eine spärliche Menge des argyrophilen Bindegewebes (Gitterfasern) begleitet die Drüsenschläuche, ein bißchen mehr Bindegewebe umgibt die größeren Blutgefäße und die Gallengänge. Eine veränderliche Menge von Pigmentzellen, welche immer das braune und lipochrome Pigment, größtenteils aber auch Lipide enthalten, ergänzt das histologische Bild. Die kubischen oder polyedrischen Parenchymzellen besitzen eine veränderliche Größe, welche von der Jahreszeit und Tätigkeit abzuhängen scheint und weisen einen verschiedenen Bau auf. Im allgemeinen besitzen sie eine distinkte Ektoplasmaschicht, welche speziell am Gallenpol sichtbar ist. In dem oberen, dem Lumen des Gallenkanälchens zugewandten Zellenteile, befinden sich beim gut ernährten Frosch kugelige Ge-

bilde, welche während der Hungerperiode verschwinden. Sie sind auf dem Mikrophoto 3 (Tafel 1) sichtbar.

Die Lipide treten im Protoplasma am häufigsten an der Außenseite des Schlauches, d. h. am Blutgefäß auf.

Den älteren Literaturangaben zufolge (Gaupp l. c.) ist die Fettinfiltration der Froschleber veränderlich. Die leichteste Aufklärung dieses Problems durch die Annahme, daß der Grad der Fettinfiltration vom Ernährungszustand des Tieres abhängt, stößt auf die Schwierigkeit, daß eben in der winterlichen Hungerperiode die sog. sekundäre Fettimpletion vorkommt, obwohl der Frosch einige Monate hindurch kein Futter zu sich genommen hat. Eine analogische Erscheinung beschreibt Berg (l. c.) beim Salamander; wir können daher auch auf den Frosch diese Schlußfolgerungen beziehen. Der genannte Verfasser gibt an, daß die sekundäre Fettimpletion, welche bekanntlich im Frühling auftritt (Ende Februar, Anfang März), eine Folge der Lipidenmobilisation ist und die Lipide aus der verfetteten Skelettmuskulatur in die Leber dringen. Der ganze Prozeß ist eine Vorbereitung zum Laichgeschäft.

Abgesehen von den Perioden der speziellen Verfettung, enthält die Zelle des Leberparenchyms wenig Lipide.

Meinen Beobachtungen zufolge ist also zu den Verfettungsperioden der Hochsommer zu rechnen, aber nur beim Weibchen. In dieser Jahreszeit besitzen weibliche Tiere eine Leber mit Zellen, welche reichliche Lipide in ihrem Protoplasma besitzen. Die chemische Analyse weist einen hohen Prozentsatz an Neutralfetten und Cholesterolestern auf. Beim Männchen steht die Sache anders, was unten ausführlicher besprochen wird.

Wir fangen die Beschreibung der histologischen Präparate mit denjenigen der Kontrolltiere an, welche 4—11 Tage lang hungerten. Es sind dies die Weibchen No 1 und 16, und das Männchen No 17.

Sektionsergebnisse: Beide Weibchen waren große, gut genährte Exemplare mit großen, sehr stark entwickelten Fettkörpern orange-gelber Farbe. Die auffallend große, helle Leber füllte den größeren Teil der Bauchhöhle auf. Der Magen war leer, ebenso Darm im oberen Teile, der untere enthielt ein wenig braunen Schleim.

Das Männchen besaß auch einen Fettkörper, aber von hellgelber Farbe. Seine Leber war groß und dunkelbraun. Der Magen und der Darm wie beim Weibchen.

Die Kontrollweibchen enthalten in der Leber einen viel höheren Prozentsatz an Neutralfetten und Cholesterolestern als die Männchen. Das Kontrollmännchen No 17, welches am 4. Tage nach dem Einfangen vertilgt wurde, besaß in der Leber 1·25% Neutralfette und 0·41% Cholesterolester. Dagegen besaß das Kontrollweibchen No 16 nach 7 Hungertagen noch 4·06% Neutralfette und 0·71% Cholesterolester. Histologisch wird eine genaue Differenz im Aussehen der Organe beider Geschlechter nach der Färbung mittels Sudan-Orange-Lösung beobachtet. Beim Männchen sehen wir eine sehr uneinheitliche Dislozierung der Lipide im Drüsenparenchym. Der überwiegende Teil des Präparates enthält im allgemeinen keine sichtbaren Lipide (Phot. 1) und dort, wo sie auftreten, erscheinen sie als große, kugelige Gebilde, größtenteils einzeln, im Protoplasma der Leberzellen (Phot. 2). Das Protoplasma aller Zellen ist feingranuliert, u. a. kommen auch kleine Körnchen von rot-brauner Farbe vor, also different von der gewöhnlich leuchtend orange-roter Farbe der Lipide nach der Sudan-Organen Färbung. Dieselben Körnchen sind auch in sehr kleinen Dimensionen am Gallenpol der Zelle sichtbar. Die Leber besitzt hier den entschiedenen Charakter einer tubulösen Drüse, die Zellen sind von kegelartiger Gestalt, ihre basalen Partien liegen an die Blutkapillaren dicht an und die engeren Spitzen umgrenzen das Lumen der Gallenkanälchen. Es werden zwei distinkt verschiedene Zellenpole unterschieden; der Blutpol besitzt das weniger dichte, vakuolisierbare Protoplasma, in dem sich die Lipidkugeln befinden, der Gallenpol weist eine verdichtete Protoplasmastruktur in Gestalt von dunklen Kugeln und den oben erwähnten feinen, rot-braunen Körnchen auf.

Beim Weibchen besitzt das Organ einen noch distinkteren tubulösen Aufbau. Auf dem Mikrophoto 3 sind die Verdichtungen des Protoplasmas an dem Gallenpol der Zelle sehr gut sichtbar. Die Parenchymzellen sind mit Lipiden angefüllt, welche in Gestalt von mittelgroßen Körnern auftreten. Die größeren werden meistens an den Zellenbasen beobachtet, höher zu verkleinert sich ihr Kaliber. Einzelne größere Kugeln sind in den Zellen kaum sichtbar. Auf dem ungefärbten Präparat zeichnen sich die Lipid-

kugeln durch eine gelbe Färbung aus, was auf das Vorhandensein von Karotenoidenzusatz hinweist. Da der Frosch einen gut ausgebildeten Fettkörper besaß, ergibt sich der Schluß, daß die Leberlipide die mobilisierten Fette des Fettkörpers repräsentieren, oder daß gerade die Leber dieselben für den Fettkörper vorbereitet, und mit Karotenoiden versehen hat.

Aus dem Obigen geht klar hervor, daß der chemisch bestimmte Prozentsatz des Fettes mit dem mikroskopischen Bild übereinstimmt. Die Weibchen besitzen mehr Lipide in der Leber, die im Drüsenparenchym anders verteilt sind als beim Männchen.

Die Lebern der Kontrollweibchen (No 2, 3, 4, 5), 13–21 Tage hindurch ausgehungert, erscheinen als dunkelbraune, weiche und ziemlich kleine (No 2, 3) oder saftreiche und ziemlich große Organe (No 4, 5). Die Weibchen No 3 und 5 besaßen einen gut entwickelten Fettkörper. Der Prozentsatz der Neutralfette ist niedrig, der Cholesterolester ziemlich hoch (siehe Tabelle I). Ein charakteristisches Merkmal der histologischen Leberpräparate dieser vier Tiere bildet eine inselartige Anordnung der Lipide im Organparenchym. Dieses ist derart gestaltet, daß die Lipide in größeren Mengen nur in diesen Parenchymzellen vorkommen, welche in der Nähe der größeren Venen gruppiert sind (Phot. 4). Da diese Venen allein liegen, gehören sie wahrscheinlich zum blutausführenden System der Leber, weil beim Frosch sowohl die Äste von *V. portae*, als auch diejenigen von *V. abdominalis*, welche das funktionelle Blut zuführen, zusammen mit den Gallengängen und Arterien (*A. hepatica*) verlaufen. Da aber beim Frosch (Gaupp l. c.) die Anfänge der Lebervene (*V. hepatica*) schwer lokalisierbar sind, ist auch die Klassifikation der Venen, welche von den mit den Lipiden angefüllten Zellen umgeben sind, zweifelhaft.

Ein derart durch Lipide infiltrierter Raum enthält die Parenchymzellen, welche mit Fettkugeln angefüllt sind, keine Verdichtung des Protoplasmas am Gallenpol aufweisen, was bekanntlich für die Leber dieser Tiere charakteristisch ist, welche viel kürzer ausgehungert wurden. Die Parenchymzellen unterscheiden sich von den oben beschriebenen (No 1, 16, 17) durch Größe und Kompaktheit des Protoplasmas. Ein Blick auf die Mikrophotos 1, 2, 3, und 6, 7 überzeugt uns, daß die auf diesen Mikrophotos sichtbaren Leberzellen bedeutend kleiner sind und daß das

ganze Organ eine verwischte tubulöse Struktur aufweist, welche auf den drei ersten Abbildungen gut sichtbar ist (Mikrophot. 1, 2, 3).

Die Lipiden treten in den Zellen des infiltrierten Raumes an ihren Blutgefäßseiten auf, was auf den Abbildungen 5, 7, 8, 9, klar zutage tritt. Auf dem Mikrophoto 7 beobachten wir distinkte Lipidenanhäufungen, welche scheinbar als einheitliche, große Gebilde auftreten. Unter einer starken Vergrößerung erscheinen sie aber als einzelne kleine Lipidkörnchen, welche die an die Blutgefäße anliegenden Teile der Leberzelle stark ausfüllen, die Zellen verlassen und entweder im Bindegewebe der Gefäßwand (Mikrophoto 8) oder in seinem Lumen frei liegen. Gleichzeitig fällt die Lipidemulsion in die Augen, welche man öfters im Gefäßlumen zu sehen bekommt (Photo 9). Dieselbe wird in den Kapillaren sowie in den Venen der infiltrierten Gegend, welche dem blutausführenden System der Leber zu entsprechen scheinen, angetroffen. Die Anhäufung der Lipide in überraschend regelmäßiger Anordnung an der den Blutgefäßen anliegenden Basis der Leberzellen und das Vorhandensein der Lipidemulsion im Blutgefäßlumen scheinen einer und derselben Erscheinung anzugehören.

Der ganze Prozeß verläuft in der Periode des Zwanghungers, da die Leber noch mit Lipiden ausgefüllt war; vielleicht kommt hier eine Mobilisierung der in der Leber abgelagerten Lipide vor, welche durch das Blutgefäßsystem das Organ verlassen.

Die lipidfreie Gegend weist unter einer starken Vergrößerung wenige Lipidtröpfchen in wenigen Zellen an dem Blutpol auf (Phot. 6). Ein bißchen distinkter treten hier die Protoplasmaverdichtungen an den Gallenpolen auf.

Wie aus dem Obigen hervorgeht, weist das histologische Bild der Leber der im Verlaufe von 13—21 Tagen ausgehungerten Tiere die in den Parenchymzellen noch immer vorhandenen Lipide aus. Ihre Anordnung ist im ganzen Organ ungleichmäßig, sie drängen sich inselartig um größere Venen. Da in der chemischen Zusammensetzung der Lipide die Cholesterolester einen verhältnismäßig hohen Gehalt aufweisen, so kann vorausgesetzt werden, daß dieselben samt der kleinen Menge von Neutralfetten das metaplasmatische Element bilden, welches in den Leberzellen nach der Sudan-Orange-Färbung sichtbar wird und wahrscheinlich allmählich aus dem Organ auswandert

Grundsätzlich identische Bilder stellen die Lebern dieser Tiere dar, welche während der Hungerperiode (26—30 Tage lang) einmal mit dem gereinigten Lezithin gefüttert wurden (No 6, 7, 8).

Sektionsergebnisse: Die Lebern sind dunkel, saftreich, klein. Der Magen enthält nur den Schleim, der Darm ist im oberen Teile leer, im Endteile mit einer milchigen, dichten Masse ausgefüllt. Dieselbe wird auch in dem prallgefüllten Dickdarm vorgefunden, ein Bißchen derselben wurde nach außen entleert. Die histologischen Präparate dieser Lebern waren einander ähnlich. Überall werden Verschiedenheiten in der Kapillarweite beobachtet, welche einmal sehr breit oder wieder ganz eng war. Diese Erscheinung übt aber keinen Einfluß auf das Auftreten der Lipide aus. Dieselben befinden sich auch hier in den basalen Teilen der Zellen, welche größere Venen umgeben. Die obenerwähnte inselartige Infiltration des Leberparenchyms wird also auch hier bemerkt. Die einmalige Verfütterung des Tieres mit Lezithin erzeugt also keine Veränderung des Lipidbildes der Leber im Vergleich mit den Kontrolltieren.

Das weitere Hungern des Tieres im Verlaufe von 31—42 Tagen beeinflußt etwas mehr die Struktur der Leber. Vor allem wird unsere Aufmerksamkeit auf das Vorhandensein (Kontrollmännchen No 14, 41 Tage lang gehungert) mehrerer und größerer Anhäufungen von Pigmentzellen gelenkt, welche mit braunem Pigment (Melanin) und gelbem Lipochrom ausgefüllt sind. In den genannten Anhäufungen kommen öfters auch Lipide vor, die in Gestalt von ziemlich großen Tropfen die Zellen ähnlich den Fettzellen ausfüllen, oder in kleineren Mengen dem braunem Pigment beigemischt sind. Die Leber besitzt eine kompakte Struktur und enge Kapillaren (Photo 10). Das Drüsenparenchym ist aus kleinen Zellen zusammengesetzt, welche keinen besonderen Gallenpol aufweisen. Die Zellen bilden keine distinkte Umgebung der Gallenkanälchen, was eine Verwischung der tubulösen Struktur des Organes verursacht. In den Zellen fehlt das Lipidelement gänzlich und deswegen werden keine, den oben beschriebenen analoge, inselartige Lipidinfiltrationen vorgefunden. Das Aussehen des Organs repräsentiert Photo 12 (Taf. 1).

Die Verfütterung des ausgehungerten Männchens mit Lezithin, viermal während 2 Tagen (No 11) oder nur einmal (No 12), be-

einflußt das mikroskopische Bild gar nicht, wie aus Photo 11 ersichtlich ist. Ebenso erzeugt eine einmalige (No 7, 8, 13), zweimalige (No 9) und viermalige (No 10) Verfütterung mit Lezithin keine Veränderungen im mikroskopischen Bilde der Leber der ausgehungerten Weibchen, welches den Kontrolltieren eigen ist.

Die Veränderungen in der Leber, welche wahrscheinlich infolge Hungerns entstehen, äußern sich in einer Vermehrung und Vergrößerung der Pigmentzellenanhäufungen (Photo 10) und in der verwischten tubulösen Struktur der Drüse, ähnlich also, wie bei den Männchen. Im Drüsenparenchym der Weibchen aber kommen immer noch Lipide vor, obwohl immer nur in einer Menge, um die basalen Zellenpartien der infiltrierten Räume auszufüllen. Sie treten in der charakteristischen Anordnung auf, wie sie oben beschrieben wurde.

Ein besonderer Fall ist der Frosch No 15. Es war ein großes Weibchen, welches 33 Tage hindurch ausgehungert, 3-mal mit Lezithin gefüttert, nach einer 9-tätigen Pause wieder einmal gefüttert und dann dekapitiert wurde.

Sektionsergebnisse: Große, dunkelbraune Leber. Der Magen und der obere Darm enthielt nur Schleim, der untere Teil des Darmes und der Dickdarm war mit weißer Emulsion prallgefüllt. Die chemische Analyse ergab sehr hohe Resultate für den Gehalt des freien und gebundenen Cholesterols und der Neutralfette (siehe Tabele III). Die histologischen Präparate zeichnen sich durch mehrere Anhäufungen von Pigmentzellen aus. Das ganze Parenchym ist mit Lipiden infiltriert, welche eine Verdichtung in der Nähe der einsamen Venen zeigen. Die kleinen Leberzellen, welche große Kerne haben, bewahren einen kaum distinkten tubulösen Aufbau. Die Lipide befinden sich im ganzen Zellenprotoplasma, öfters scheinen sie das Protoplasma diffus zu durchtränken.

Auf Grund der bisherigen Resultate kann es kaum für möglich gehalten werden, daß eine Lezithinverfütterung eine solche Lipidinfiltration erzeugen könnte. Dieses Bild kann also als eine Analogie zur sekundären Fettimpletion, welche durch das lange Hungern hervorgerufen wurde, interpretiert werden. Es könnte auch eine individuelle Verwirrung des Prozesses der Leberentfettung infolge des Hungers sein, dessen Einfluß sich in mehreren

Pigmentzellen, in einer Verminderung der Parenchymzellen und im Schwund ihrer polaren Protoplasmaverdichtung äußert.

Da das längere Hungern die histologische Struktur der Froschleber auffallend beeinflusst, kann man voraussetzen, daß es auch die normale Tätigkeit der Drüse verändern könnte. Deswegen entschloß ich mich, vier Bestimmungen des Lipidgehaltes der Leber von zwei Weibchen und zwei Männchen zu unternehmen, welche in den ersten Hungertagen lebten. Die Resultate der chemischen Analyse wurden in Tabelle III festgehalten. Die histologischen Präparate aus der Leber der Kontrolltiere sind am Anfang dieses Kapitels beschrieben worden. Die Präparate aus den Versuchswelibchen entsprachen in der Gänze denjenigen aus den Kontrolltieren. Dagegen enthalten die Präparate aus der Leber des Versuchsmännchens fast keine Lipide in den Parenchymzellen. Dieselben zeichnen sich durch ein durchsichtiges, vakuolisierbares Protoplasma und durch dessen polare Verdichtungen aus. Sehr selten enthalten sie einzelne Fettkörnchen. Dieses Bild stimmt sehr gut mit dem außerordentlich niedrigen Prozentsatz der Glizerol- und Cholesterolester überein (Tabelle III, ♂ No 19).

Die Mitochondrien treten in der Leber der Kontrolltiere in der Periode des kurzen Hungerns in Gestalt von dicken, kurzen Stäbchen oder von dünnen faserigen Gebilden auf. Dieselben füllen die ganze Zelle aus und am Gallenpol bilden sie ein dichtes System, welches ein charakteristisches Merkmal des Präparates ist. Wenn es in allen Zellen sichtbar ist, dann wird das Lumen des Gallenkanälchens seitlich von diesen Mitochondrienanhäufungen an den Spitzen der Parenchymzellen umgeben. Von Weatherford (24) wird an dieser Stelle der Golgi'sche Binnenapparat erwähnt, welcher »especially in summer is reticular and open-meshed« (S. 349). Angeblich unterliegt seine Größe periodischen Modifikationen, nicht aber seine Lage. Die von mir beschriebene apikale Anhäufung der Mitochondrien verschwindet mit dem Hungern. Es ist wahrscheinlich eine vom Golgi'schen Apparat verschiedene Struktur, welche mit den sekretorischen Funktionen der Leber im Zusammenhange steht und sogleich verschwindet, sobald die letzteren einer periodischen Hemmung unterliegen, z. B. während der Hungerperiode.

In den Leberzellen, welche mehrere Lipidkörnchen enthalten (Weibchen No 1 oder 16), sind auch viele Mitochondrien unter den

Lipidkugeln sichtbar. Dieselben sind zart, dünn, öfters leicht gewunden und sehr zahlreich; ihr Vorhandensein scheint von einer großen, physiologischen Aktivität zu zeugen und ebenso davon, daß die »Verfettung« in unserem Fall physiologischer Natur ist. Im entgegengesetzten Falle verringert sich angeblich ihre Anzahl und ihr Aussehen verändert sich.

In der Leber des Männchens, welche, wie oben dargestellt wurde, keine größere Anzahl von Lipiden enthält, sehen auch die Mitochondrien anders aus: sie sind kürzer, dicker, eher stäbchenartig als faserig und weniger zahlreich. Mit dem andauernden Hunger verändern sich die oben beschriebenen Mitochondrien des Weibchens in dicke Stäbchen, die in der ganzen Zelle zerstreut liegen und sich an deren basalen Teile, um das Blutgefäß herum sammeln. Die Lage ist deshalb charakteristisch, weil die Lipide jetzt auch in den basalen Teilen der Zellen sichtbar werden, wovon sie durch die Blutgefäße abtransportiert werden.

Im Vergleich zu den Kontrolltieren wurden keine Unterschiede im Aussehen und in der Lage der Mitochondrien der Leberzellen der mit Lezithin gefütterten Tiere beobachtet.

### Diskussion.

Wenn wir die Ergebnisse der chemischen Untersuchungen über den Level der Lipide der ausgehungerten und der mit gereinigtem Lezithin gefütterten Frösche vergleichen, so kommen wir zur Überzeugung, daß der Phosphatidgehalt des Organs unter dem Einfluß der in 15-stündigen Abständen erfolgten ein-, zwei- und mehrmaligen Verfütterung, fast keiner Veränderung unterliegt. Aus diesen können wir den Schluß ziehen, daß die resorbierten Produkte der Hydrolyse des Lezithins in der Leber nicht resynthetisiert werden. Es darf jedoch der Frage nicht vorgegriffen werden, ob die resorbierten ungesättigten Fettsäuren des Lezithins den Leberphosphatiden einverleibt werden, nachdem die gesättigten Fettsäuren verdrängt worden sind, wodurch der quantitative Zustand übrigens gar keiner Veränderung unterliegen würde (Sinclair u. a.). Dieser Umstand hängt damit zusammen, daß der Organismus eventuell gezwungen ist, die exogenen ungesättigten Fettsäuren zurückzuhalten, welche bekanntlich das Tier im beschränkten Grade zu synthetisierten imstande ist.

Die oben dargestellten chemischen Untersuchungen beweisen, daß ein Präzisionsmechanismus existiert, welcher den Phosphatidgehalt in der Leber reguliert, was übrigens mit der Rolle eines konstanten Elementes, »élément constant« (Terroine) übereinstimmt. Als ein morphologisches Korrelat des letzteren könnten die Mitochondrien angesehen werden. Zwar setzen sich dieselben nicht aus Phosphatiden selbst zusammen, sondern bilden wahrscheinlich einen veränderlichen Komplex aus Lipid-Eiweiß, aber ihr teilweiser Phosphatidcharakter wurde schon seit langem in der Literatur hervorgehoben. Der verhältnismäßig hohe Prozentsatz der Phosphatide in der Leber des Frosches (ca 2%) findet ein Korrelat in dem gut entwickelten Mitochondrienapparat der Leberzellen. Der letztere unterlag zwar während der Versuchsperiode gewissen Modifikationen, aber es waren morphologische Veränderungen, welche die Gestalt oder die Anordnung, nicht aber das Vorhandensein des Elementes betrafen, welches immer in den Parenchymzellen des Organes erschien.

Obwohl jetzt die älteren Theorien über die unmittelbare Teilnahme der Mitochondriensubstanz an der Synthese der Fette z. B. modifiziert wurden und modernen Anschauungen zufolge die Fette im Protoplasma unabhängig von den beständigen Zellstrukturen (Zweibaum 25, Szantoch 23) auftreten, so muß jedoch bemerkt werden, daß dieser morphologische Rückzug der Mitochondrien von der Beteiligung am Fettstoffwechsel dann vorkommt, wenn biochemische Grundlagen für diese Hypothese gegeben zu sein scheinen. Mehrere Biochemiker, welche die Teilnahme der Phosphatide am Fettstoffwechsel annehmen, behaupten nämlich, daß die Fettsäuren in die Molekeln der Phosphatide einverleibt und in dieser Gestalt weiter transportiert werden oder den Umwandlungen unterliegen. Ich beschränke die Funktion der Mitochondrien gar nicht auf die letztere Rolle, ich meine aber, daß der Anteil der Mitochondrien am Fettstoffwechsel eine von ihren vielen Tätigkeiten ist. Berg (l. c.) beschreibt das Schwinden der Mitochondrien aus dem Protoplasma der Leberzellen des Salamanders in der Periode der Fettresorption und dann ihr Neuerscheinen. Dies wäre das morphologische Korrelat des chemischen Umbaus der Leberphosphatide im Zusammenhang mit der Einverleibung (incorporation) der gelieferten neuen Fettsäuren.

Während der Untersuchungen unterliegt die Leber infolge Hungerns bedeutenden morphologischen Veränderungen, wie aus oben beschriebenen histologischen Präparaten und aus den beiliegenden Mikroaufnahmen auf Tafel 1 hervorgeht. Das tubulöse Aussehen des Organes verändert sich, der Aufbau des Protoplasmas unterliegt den Veränderungen, die Zellen werden kleiner, die Lipide verschwinden größtenteils aus denselben, wobei manche Kennzeichen der Leberentfettung beobachtet werden.

Chemische Untersuchungen ergaben, daß quantitative Veränderungen infolge des verringerten Prozentsatzes der Glizeride und teilweise auch der Cholesteride zustande kamen. Es ist bekannt, daß eine Leberverfettung leicht hervorgerufen werden kann, wenn die Fette durch den Darm dem Organismus zugeführt werden. In unserem Falle dagegen benutzt die Leber nicht die ihr gelieferten Fette aus dem zerlegten Lezithin. Weder eine einmalige noch eine mehrmalige Lezithinzuführung ruft eine Hebung des Neutralfettlevels in der Leber hervor. Die Ursache hiefür liegt in der Wirkung des Cholins, welches aus der Zerspaltung des Lezithins im Darm entsteht. In den letzteren Jahren wurde eine ganze Reihe von Arbeiten publiziert, welche die wichtige Erfindung von Best (9—15) über das erwähnte Thema behandeln. Der genannte Verfasser lieferte den Beweis, daß man der Leberverfettung vorbeugen kann oder sogar die weit fortgeschrittene Fettinfiltration zurückstellen kann, wenn man zur Fütterung entsprechende Menge von Cholin oder eine Substanz zusetzt, aus welcher dieses entsteht, also z. B. das Lezithin. Die Wirkung des Lezithins behandelt eine spezielle Arbeit (Best, Hershey, Huntsman 10). 0.5 g Lezithin täglich reichen gänzlich aus, um der Leberverfettung der Ratte, welche einer hochprozentigen Fettdiät unterworfen wurde, vorzubeugen. Es zeigte sich, daß in diesem Fall der eigentlich wirksame Faktor nur das Cholin war (Best, Huntsman 11), welches, ob per os zugeführt oder auch intravenös in entsprechender Menge injiziert, speziell nur auf die Leber einwirkte. Dieses Problem behandeln viele Publikationen von Best und seinen Mitarbeitern und von Channon und seinen Mitarbeitern (siehe Literaturverzeichnis). Es zeigte sich, daß außer Cholin und cholinogenen Substanzen, auch andere Stoffe eine analoge Wirkung ausüben, z. B. Caseinogen.

Die zitierten Ergebnisse von Best und Channon erbringen den Beweis, warum in meinen Versuchen mit Lezithinverfütterung keine Neutralfette in der Leber vorkamen. Das Vorhandensein des Cholins beugte diesem Umstand vor. Die Einwirkung des Cholins auf die Ratte wurde von den Autoren der oben erwähnten Arbeiten bestätigt. Meinen Beobachtungen zufolge können die obigen Feststellungen auch auf den Frosch übertragen werden. Der spezifische Einfluß des Cholins auf den Lipidstoffwechsel der Leber gewinnt allgemeinere Bedeutung dadurch, daß er auch bei niederen Vertebraten festgestellt wurde.

### Zusammenfassung.

1. Das Hungern der Frösche im Sommer erzeugt auffallende Veränderungen im mikroskopischen Bilde der Lipide der Leber, während chemische Analysen ergeben, daß sich der Gehalt an Phosphatiden und an freiem Cholesterol nicht verändert; das Hungern ruft jedoch eine Senkung des Prozentsatzes der Neutralfette und der Cholesterolester hervor.

2. Die Verfütterung mit gereinigtem Lezithin ruft keine Veränderungen hervor. Die aus den Hydrolyseprodukten des Lezithins im Darm entstandenen Neutralfette lagern sich in der Leber nicht ab.

3. Der letztere Umstand scheint dadurch erklärt zu werden, daß das aus Lezithin entstandene Cholin der Fettinfiltration der Leber vorbeugt.

4. Die Verfütterung mit Lezithin hebt den Phosphatidenlevel der Leber nicht.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr L. Marchlewski für das mir zur Verfügung gestellte Institut und Herrn Dr J. Z. Robel für seine wertvollen Ratschläge und liebenswürdige Teilnahme an meinen Experimenten zu danken.

Aus dem Institut für physiologische Chemie, Vorstand: Prof. Dr L. Marchlewski und dem histologischen Institut der Jagellonischen Universität in Kraków, Vorstand: Prof. Dr S. Maziarski.

### Erklärung der Mikrophotos auf Tafel 1.

Alle Abbildungen wurden unter Zuhilfenahme des Leitzschen »Panphot« aufgenommen.

Abb. 1. ♂ Kontrolltier, 4 Tage gehungert, das Drüsenparenchym weist keine Lipide auf. Vergr. 375×.

Abb. 2. Dasselbe Tier, eine Gegend der Leber, in welcher die Zellen Lipidkugeln enthalten. Vergr. 375 X.

Abb. 3. ♀ Kontrolltier, 10 Tage gehungert. Sichtbar ist ein distinkter tubulöser Charakter der Drüse und viele Lipide in den Leberzellen. Vergr. 375 X.

Abb. 4. ♀ Kontrolltier, 21 Tage gehungert, eine infiltrierte Gegend des Leberparenchyms, welche eine Vene umgibt. Vergr. 75 X.

Abb. 5. Dasselbe Tier, starke Vergrößerung der infiltrierten Gegend. Vergr. 375 X.

Abb. 6. Dasselbe Tier, starke Vergrößerung der lipidfreien Gegend. Vergr. 375 X.

Abb. 7. ♀ Kontrolltier, 13 Tage gehungert. Die Lipide sichtbar in den basalen Teilen der Leberzellen, an der Außenseite der Drüsenschläuche. Vergr. 375 X.

Abb. 8. Dasselbe Tier, die Lipide treten frei im Bindegewebe der Gefäßwand auf. Vergr. 375 X.

Abb. 9. Dasselbe Tier, eine Fettemulsion im Gefäßlumen sichtbar. Vergr. 375 X.

Abb. 10. ♀ gefüttertes Tier, 42 Tage gehungert, sichtbar mehrere Anhäufungen von Pigmentzellen im Drüsenparenchym. Vergr. 150 X.

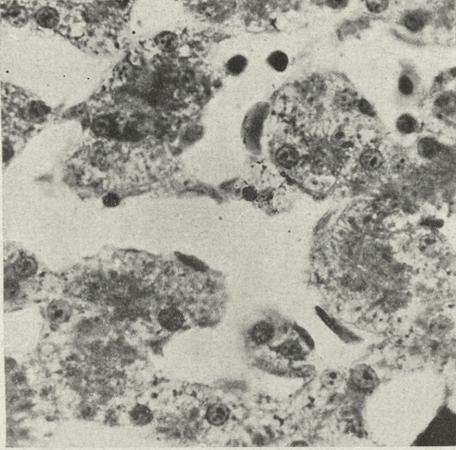
Abb. 11. ♂ ein viermal gefüttertes Versuchstier in den Leberzellen treten keine Lipide auf. Vergr. 375 X.

Abb. 12. ♂ ein 41 Tage ausgehungertes Kontrolltier. Das Bild gleicht vollkommen der 11. Abbildung. Vergr. 375 X.

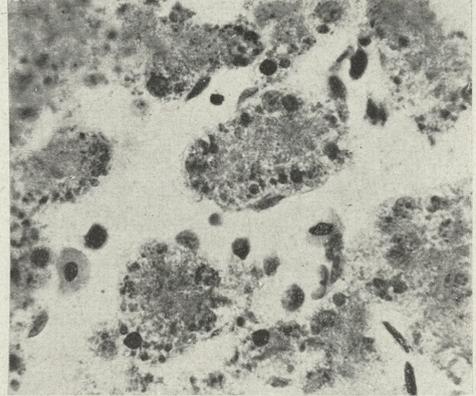
### Literaturangabe.

- 1) Ackermann J.: Bull. Int. d. l'Acad. Pol. d. Sc. Lettres, Série B, 1936. — 2) Ackermann J.: Ibidem. — 3) Aylward, Channon, Wilkinson: Biochem. Journ. 29 Bd. 1935. — 4) Berg W.: Arch. f. mikr. Anat. Bd. 94 1920. — 5) Derselbe: Ibidem Bd. 96 1922. — 6) Derselbe: Ztschr. f. mikr.-anat. Fg. Bd. 1 1925. — 7) Beeston, Channon, Wilkinson: Biochem. Journ. Bd. 29 1935. — 8) Beeston, Wilkinson: Ibidem, Bd. 29 1935. — 9) Best, Channon: Ibidem Bd. 29 1935. — 10) Best, Hershey, Huntsman: Journ. of Phys. Bd. 75 1932. — 11) Best, Huntsman: Ibidem Bd. 75 1932. — 12) Best, Channon, Ridout: Ibidem Bd. 83 1935. — 14) Best, Ridout: Ibidem Bd. 84 1935. — 15) Best, Huntsmann, McHenry, Ridout: Ibidem Bd. 84, 38 P. — 16) Channon, Wilkinson: Biochem Journ. Bd. 23 1934. — 17) Channon, Wilkinson: Ibidem Bd. 29 1935. — 18) Channon, Smith: Ibidem Bd. 30 1936. — 19) Gaupp E.: Anatomie des Frosches Bd. III. (Die Lehre von den Eingeweiden). — 20) Langley: Proceed. of the Royal Soc. of London Bd. 39 1886, zit. nach Gaupp. — 21) Leonard A.: Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. Suppl. 1887. — 22) Sinclair: J. biol. chem. Bd. 115 1936. — 23) Szantroch Z.: Arch. f. exp. Zfg. Bd. 13, 1933. — 24) Weatherford H. L.: Zschr. f. Zellfg. u. mikr. Anat. Bd. 15 1932. — 25) Zweibaum J.: Folia morphologica Bd. VII. 1936/37.

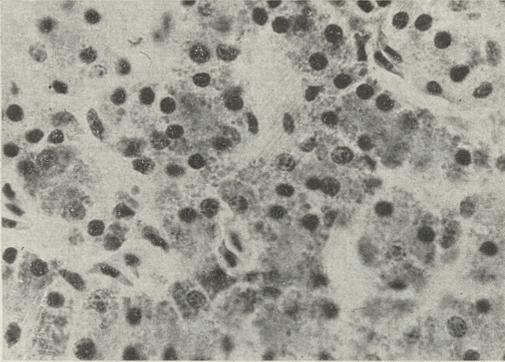




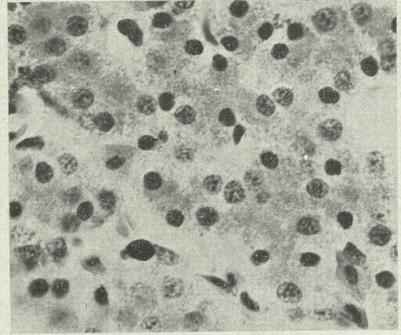
1



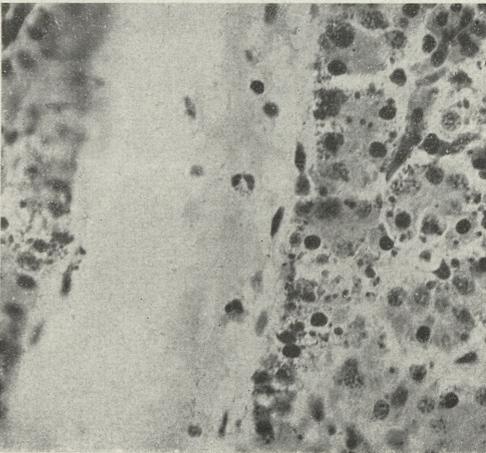
2



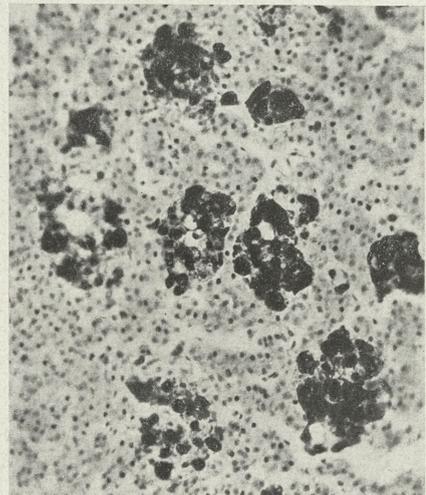
3



7



9



10

J. Ackermann phot.



*Studia doświadczalne nad ekologią termiczną rozwijających się jaj niektórych płazów (Rana, Bufo, Pelobates). — Experimental studies in thermal ecology of developing eggs of some amphibians (Rana, Bufo, Pelobates).*

Mémoire

de M. J. S. MIKULSKI,

présenté le 10 Janvier 1938 par M. M. Siedlecki m. t.

### I. The Problem

The influence of various temperatures on the development of eggs of amphibians, especially those of frogs has been the subject of many a former investigation. The problem is a physiological one, and belongs to the sphere of developmental mechanics. In this research the analysis of vital possibilities of an egg or embryo in regard to the influence of temperature, just the same as their regulative power was taken under consideration. On the other hand, the effect of the influence exhibited on the developing organism, has also an ecological value.

Ecology deals with the developing organism as a whole. The final effect of the thermic influence is only important for this entirety. This final effect is exhibited in the change of the rate of development and in varying survival of individuals. Larger or smaller survival of developing eggs, decides whether the biological balance of the animal community will be maintained or not. A strong »biological potential« of the organism is the first condition, which enables it to be important in the biotic community.

It is a common feature of every organism to have a special ecological »niche«. The harmony between organism and environment is founded on the important basis of different adaptations.

They may be structural or functional, for example: the special metabolism of processes, shape of behaviour etc. This suggests the accordance of the physiological constitution of an animal with his natural environmental conditions. In other words the question is, whether the animals living in similar ecological conditions have the same physiological constitution, harmonized with those external conditions, or whether this constitution is the systematic feature. In the latter case the representatives of the *genus* should have similar constitution, although they live in different ecological niches. The experimental evidence of those problems may enable us to draw conclusions, whether a certain environment for those species is natural, and whether there is a possibility for their further dispersal towards new habitats.

The breeding habits of frog and the development of its eggs present a very suitable material for studying the above mentioned problems. There are many species, which breed in different thermic seasons of the year. Some of them spawn in the strictly determined months. The results of the work of Savage (1935) show, that the spawning time depends upon the thermal character of the whole preceding winter. Juszczuk (1907) tries to show the dependence of some frog spawning on the rainfall. The phenomenon of spawning is slightly complicated by the fact, that the same species breed occasionally two or more times in spring and in summer, that means in different thermic conditions.

The most important investigations done in the field of thermal influence on the development of frog eggs were reviewed by the writer in his former publication (Mikulski 1936). They are also some publications, dealing with the influence of temperatures on different physiological processes, as the heart beat frequency (K. Th. Andersen 1930, A. W. Wells 1935), respiration rate and growth (A. M. Wood 1932, J. Gray 1928 a, b). The eggs of the fishes were taken under consideration in their relation to temperature, by M. Leiner (1932) and T. Yamamoto (1933). The results show the disagreement between the behaviour of eggs and the rules of van t'Hoffs and Arrhenius, what suggests the possibility of changes in thermal coefficients (Sizer 1936). The thermal gradients were used in the research of J. L. Dean and M. A. Tazelaar (1928), and of M. A. Tazelaar and J. S. Huxley (1930). Some publications are concerned with the in-

fluence of changing temperatures on the development of fish eggs. M. Kowajiczi (1934), T. Yamamoto (1933) and H. Lechler (1930) describe, that this influence is different from that of constant temperatures. G. Castelnovo (1932) states the analogical influence on the eggs of axolotl. In the majority of cases, the behaviour of eggs during their development was found disagreeing with the rules of constant temperature coefficients. The eggs behave rather according to the exponential law (stated by Janisch 1932). A number of new investigations have to be done, to prove the accuracy of this law.

## II. The construction of experiments

To analyze the problems shown in preceding chapter a series of experiments were done. The eggs of anourous amphibians belonging to the three species: *Rana temporaria temporaria* L., *Bufo bufo bufo* Lin, and *Pelobates fuscus fuscus* Laur., served for the material. These species represent the following families: *Ranidae*, *Bufo* and *Pelobatidae*; they are enough remote in system, to show some physiological differences. On the other hand, the breeding seasons of those frogs and toads is almost the same or lies very closely to each other. The eggs are laid in spring, in season when the mean monthly temperature is low (April  $7.8^{\circ}$ ), and day and night fluctuations very high. On account of that the eggs are expected to have the eurythermic structure.

Two series of experiments were done. First, the influence of constant temperatures on the development was investigated. The aim of these experiments was, to determine the vital range of eggs of particular species and to compare them. In the second group of experiments the symmetrically alternating temperatures were used (Mikulski 1936, Voute 1935). The constant temperature cultures (bred in temperatures, which were arithmetic means for the alternating ones) were used as controls. The duration of development and survival of eggs were investigated in all temperature cultures.

The electric incubators were used. They were heated with resistance heaters. The incubators which ought to maintain the temperatures varying from  $10^{\circ}$  to  $20^{\circ}$  were supplied with heaters and with cooling coils with running water. The thermostats of

aneroid drum type filled with ether vapours were applied. In the range of temperatures from 2° to 10° the experiments were conducted in electric refrigerator especially adapted. The largest fluctuations in the apparatus were 0,3° C.

The experimental cultures were controlled in every 12 hours, in scope of elimination of dead eggs. Since the first hatchings the observation took place every second or third hour of a day. The determination of the night hatchings might have had some mistakes not larger however, than 12 hours. The experiments with alternating temperatures were arranged to simulate natural conditions, that means, that the cultures were located in lower temperatures by night. Consequently, the amount of night hatchings was very small.

The definition of the hatching point in case of *Rana temporaria* was easy, very difficult however in those of *Bufo* and *Pelobates*. The newly hatched tadpoles of the grass frog stay a bit of time silent, being attached to the egg membrane. Then, they become mobile and swim quickly. For the moment of hatching the writer accepts the point when the tadpoles begin to swim. In the case of *Bufo* and especially that of *Pelobates* the egg membranes become dilute in higher temperatures and the embryos fall down to the bottom of the container, even in the early stages f. i. that of neurula. Such young stages can't be accepted for stage of normal hatching. The form of the tadpole's body will be formed later; at the moment, when the tail grows to one third of the length of the whole body the tadpoles become mobile. This moment is accepted for the hatching moment.

The jars with the culture animals contained  $\frac{3}{4}$  litre of water. When translocated from one incubator to another the water changed slowly its temperature. In connection with this, the eggs were actually submitted to the influence of *changing* but not *alternating* temperatures, what had been already suggested in the planning of this experiments. Thanks to this fact the experiments approach natural conditions. The experiments were arranged in temperatures with intervals of 3°. There were used in it the temperatures: 2°, 5°, 8°, 11°, 14°, 17°, 20°, 23°, 26°, 29° and 32°. The combinations of alternating temperatures were based on mean temperatures mentioned above. The smallest combination differed from the constant mean temperature of  $\pm 3^\circ$  and the amplitude

TABLE I  
showing the experimental data in *Rana temporaria*

Temperatures constant and corresponding alternating ones C°	Number of eggs used in experiments	Percent of survival	Mean percent of survival in different altern. temp. of the same mean	Developmental period in hours	Mean devel. time in diff. alter. temperatures of the same mean	Remarks
26° const.	394	44.08	—	68	—	
23° const.	348	56.60		57		
26°—20°	109	24.77		68		
20° const.	129	97.60		72		
23°—17°	112	63.28	53.51	76	72.00	
26°—14°	111	43.75		68		
17° const.	94	63.83		95		
20°—14°	165	71.95		95		
23°—11°	128	67.50	63.27	95	84.30	
26°—8°	133	50.37		68		
14° const.	100	67.00		140		
17°—11°	140	80.00		132		
20°—8°	155	88.32	76.28	140	124.70	
23°—5°	169	91.12		123		
26°—2°	116	45.69		104		
11° const.	184	53.64		200		
14°—8°	200	91.00		189		
17°—5°	147	75.00	75.33	332	271.00	
20°—2°	194	60.82		392		
8° const.	90	18.88		287		
11°—5°	148	—		—		
14°—2°	173	—		—		
5° const.	97	7.00		525		

of fluctuations must have been 6°. The second combination had the amplitude of 12°. In the third one, temperature fluctuated 9° down or up (amplitude 18°). The last combination, the largest of all had the amplitude of 24°. The four alternating combinations were not possible to apply for all mean temperatures (mentioned above). This took place only in case of temperature 14° and 17°. In all other cases, only two or three combinations were applied.

### III. The results of experiments

The general vital range of investigated eggs in constant temperatures lies between 2° and 28°. The most resistant are the eggs of *Pelobates fuscus*, the lowest point of time-temperature curve (Textfig. 3) being 24.8°. In higher temperatures their development becomes slowed. The eggs of *Rana temporaria* occupy the second place. The lowest point of the time-temperature curve (Textfig. 1) is 23.6°, and the diminution of developmental velocity in higher temperature is larger, than in *Pelobates*. The most sensitive are the eggs of *Bufo bufo*, their lowest point of time-temperature curve (Textfig. 2) being 21.5°. The undermost margin of thermic range is lowest in the case of *Bufo*, but *Rana* and *Pelobates* are found more sensitive against low temperatures. Besides the extreme zones the maximal and the minimal ones, the time-temperature curves run almost paralelly. The differences in the developmental period of particuliar species in a given temperature are not larger than 30 hours. The development of *Rana* is the fastest, the next comes *Bufo* and then *Pelobates*. The curves run in the shape of the chain curve of Janisch. The accurate statement, whether the eggs react according to exponential law was impossible in the experiments. Some necessary data which would enable us to calculate the constants for the curve were lacking.

The results of experiments with alternating temperatures are shown in tables I—III. The data represented there show in the fifth column the developmental time in different alternating temperatures and constant ones. They are based on observations concerning the time in which most of the individuals were hatched. Constructing the curves, most of the authors have used the data of the earliest hatchings. This may be true from the physiological point of view. The writer believes, that these data

TABLE II  
showing the experimental data in *Bufo bufo*

Temperatures constant and corresponding alternating ones C°	Number of eggs used in experiments	Percent of survival	Mean percent of survival in different altern. temp. of the same mean	Developmental period in hours	Mean devel. time in diff. altern. temperatures of the same mean	Remarks
29° const.	113	—	—	—	—	
26° const.	147	—	—	—	—	
29°—23°	99	28·28	—	68	—	
23° const.	63	3·17	—	78	—	
26°—20°	140	10·00	—	68	—	
29°—17°	133	—	—	—	—	
20° const.	117	45·29	—	78	—	
23°—17°	103	43·68	—	78	—	
26°—14°	127	66·14	53·94	92	91·30	
29°—11°	134	52·50	—	104	—	
17° const.	112	51·69	—	103·5	—	
20°—14°	132	72·57	—	104	—	
23°—11°	134	85·81	61·28	104	107·00	
26°—8°	109	66·97	—	104	—	
29°—5°	96	19·79	—	116	—	
14° const.	115	59·13	—	151	—	
17°—11°	125	92·00	—	140	—	
20°—8°	107	87·85	79·81	123	123·70	
23°—5°	121	70·40	—	116	—	
26°—2°	129	68·99	—	116	—	
11° const.	123	90·24	—	223	—	
14°—8°	128	84·25	—	188	—	
17°—5°	125	97·60	87·03	164	168·30	
20°—2°	130	79·26	—	153	—	
8° const.	231	41·12	—	296	—	
11°—5°	176	65·91	81·81	272	260·00	
14°—2°	131	97·71	—	248	—	
5° const.	187	15·43	—	501	—	
8°—2°	197	14·53	—	573	—	
2° const.	102	—	—	—	—	

have a smaller value for the ecology of animals than those used in experiments. In many cases however, the time of hatching of the majority of the individuals was the earliest time of hatching in the given temperature conditions.

From the presented results it seems evident, that the time of development depends on many factors. The two of them are very important: the amplitude of thermic fluctuations and the position of mean temperature for the symmetric alternations, in scale of vital range of an animal. To obtain a synthetic picture of the influence of alternating temperatures on the development of eggs, the results were also represented in curves showing the calculated mean time of development as affected by the alternations of temperature of different amplitudes, but of the same mean temperature. The points of the curve do not represent real periods of development, but are mean retardations or accelerations in relation to the developmental period in a corresponding constant temperature.

Mean differences in the developmental time in alternating temperatures for the *Rana temporaria* make the curve resembling the chain curve, but less steep than that of constant temperatures (Textfig. 1).

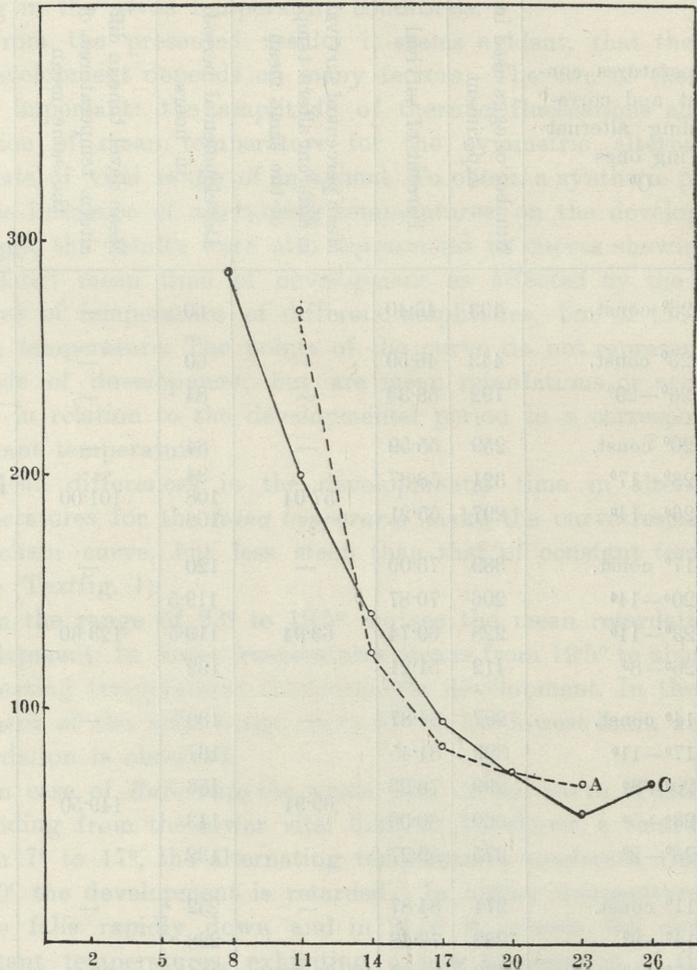
In the range of  $23^{\circ}$  to  $19.5^{\circ}$  we see the mean retardation of development. In lower temperatures means from  $19.5^{\circ}$  to about  $13^{\circ}$  alternating temperatures accelerate the development. In the next segment of the vital range, from  $13^{\circ}$  to the lowest limit, another retardation is observed.

In case of *Bufo bufo* the whole part of the curve (Textfig. 2) extending from the lower vital limit to  $7^{\circ}$ , shows a retardation. From  $7^{\circ}$  to  $17^{\circ}$ , the alternating temperatures accelerate, from  $17^{\circ}$  to  $20^{\circ}$  the development is retarded. In higher temperatures the curve falls rapidly down and in  $21.5^{\circ}$  it crosses the curve of constant temperatures, exhibiting a new acceleration of the development. When we compare this experimental case to some others, we must presume that in this combination ( $29^{\circ}$ — $17^{\circ}$ ) the retardation should also take place. This retardation should be so large, that the mean calculated with the other data should be not smaller, than that of the combinations of mean constant  $20^{\circ}$ . Another similar retardation is observable in the alternating temperatures for the constant mean  $26^{\circ}$ , which is the extreme.

TABLE III  
showing the experimental data in *Pelobates fuscus*

Temperatures constant and corresponding alternating ones C°	Number of eggs used in experiment	Percent of survival	Mean percent of survival in different altern. temp. of the same mean	Developmental period in hours	Mean devel. time in diff. altern. temperatures of the same mean	Remarks
26° const.	403	46.40	—	60	—	
23° const.	443	46.50	—	60	—	
26°—20°	192	58.33	—	84	—	
20° const.	259	55.59	—	84	—	
23°—17°	321	58.87	—	94	—	
26°—14°	297	55.21	57.04	108	101.00	
				108		
17° const.	389	73.00	—	120	—	
20°—14°	206	70.87	—	119.5	—	
23°—11°	228	69.74	63.94	119.5	123.60	
26°—8°	412	51.21	—	132	—	
14° const.	297	87.87	—	180	—	
17°—11°	329	81.45	—	167	—	
20°—8°	299	78.93	—	156	—	
23°—5°	360	60.00	69.91	143	149.50	
26°—2°	275	59.27	—	132	—	
11° const.	271	84.87	—	252	—	
14°—8°	223	76.68	—	228	—	
17°—5°	472	72.03	68.35	215	203.30	
20°—2°	236	56.35	—	167	—	
8° const.	257	70.42	—	350	—	
11°—5°	337	57.56	—	323	—	
14°—2°			56.45		317.25	
5° const.	270	38.51	—	588	—	

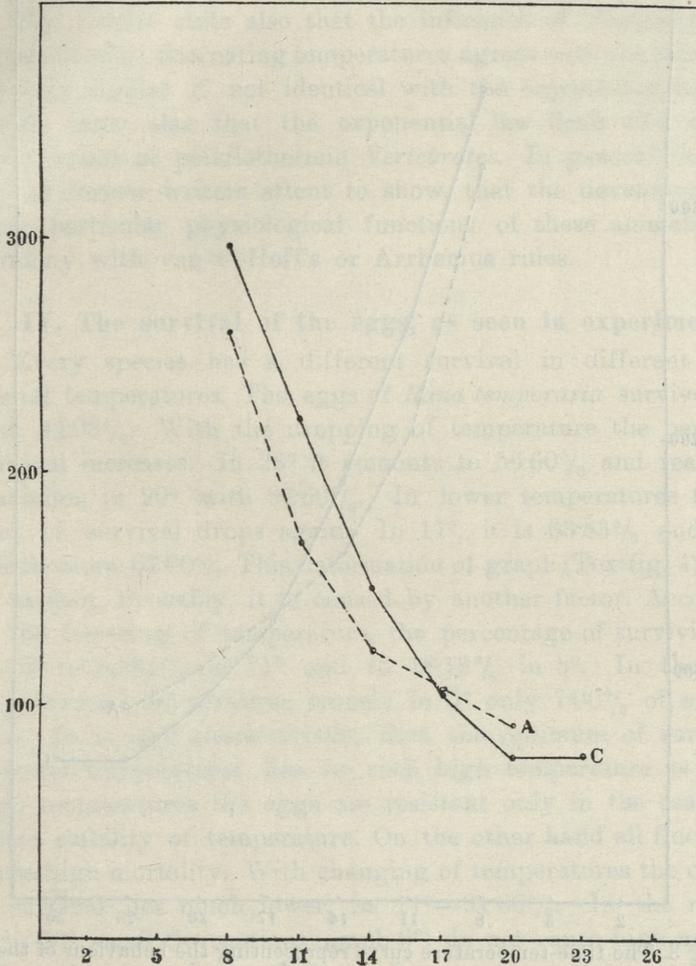
For *Pelobates fuscus* the average changes of development are very similar to those of *Bufo*. Whole the lower segment of the



Textfig 1. The time-temperature curves representing the behaviour of the eggs of *Rana temporaria* in different temperatures. Ordinates in hours of development, abscissae the temperatures. Solid line represents the development in constant temperatures, interrupted line the mean developmental time in different alternating temperatures.

vital range reacts against alternating temperatures with a consequent retardation of development. In the vicinity of 7° another

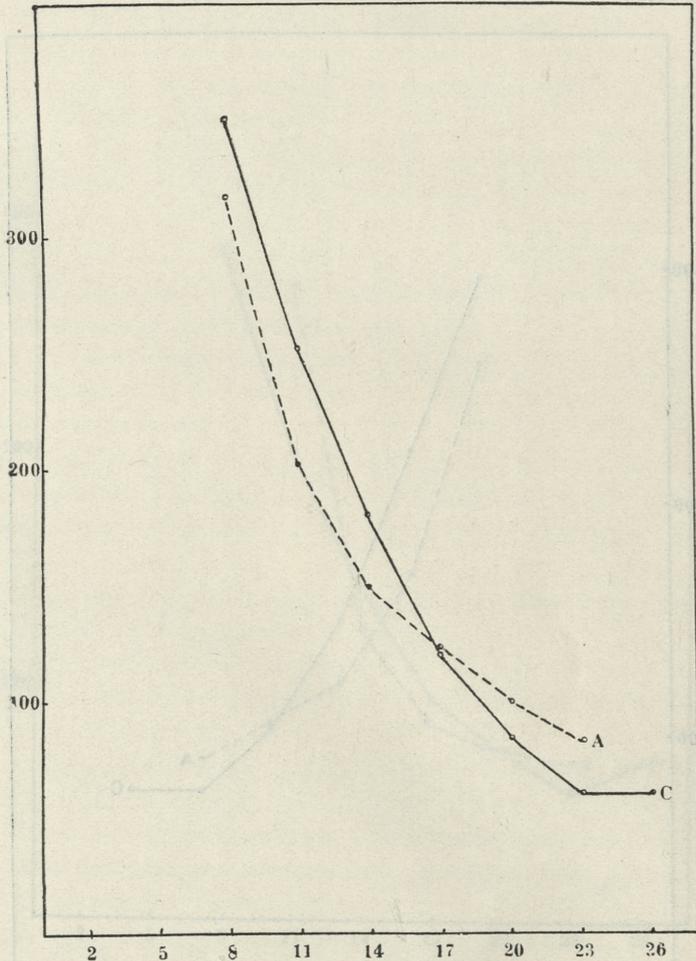
part of the curve is begun, in which the acceleration of development is exhibited. This segment ends in the temperature of ca  $16.5^{\circ}$  giving place to a new retardation of development extending to the upper vital limit of the eggs.



Textfig. 2. The time-temperature curves representing the behaviour of the eggs of *Bufo bufo* in different temperatures. The indications see Textfig. 1.

In discussing the results of experiments with constant temperatures, it was pointed out, that the shape of the curves representing time-temperature relations, resemble the chain curves

of Janisch. It ought to be stressed that the diagrams of alternating temperatures have a similar shape. They are only either a little shifted in the scale (in comparison to the curves of con-



Textfig 3. The time-temperature curve representing the behaviour of the eggs of *Pelobates fuscus* in different temperatures. The indications see Textfig. 1.

stant temperature) or their steepness is larger or smaller. The curve becomes less steep with the higher amplitude of fluctuations.

This phenomenon was observed by Kaufmann (1932). He points out, that when experimenting with temperatures (constants)

we must use the most accurate apparatus. In case of little fluctuations of temperature, the data, which do not correspond with normal chain curves, are obtained. Those remarks, of rather a methodic value were proved by our experiments in which the fluctuations of temperature were the experimental purpose.

The results state also that the influence of (rhythmically and symmetrically) alternating temperatures agrees with the laws, which are very similar if not identical with the exponential law. The results show also that the exponential law deals also with the development of poikilothermic *Vertebrates*. In general the majority of former writers attempt to show, that the development and some particular physiological functions of these animals are in harmony with van t' Hoff's or Arrhenius rules.

#### IV. The survival of the eggs, as seen in experiments

Every species has a different survival in different experimental temperatures. The eggs of *Rana temporaria* survive in 26° with 44.08%. With the dropping of temperature the percent of survival increases. In 23° it amounts to 56.60% and reaches its maximum in 20° with 97.60%. In lower temperatures the percent of survival drops again. In 17°, it is 63.83% and in 14° a little more: 67.00%. This deformation of graph (Textfig. 4) is hard to explain. Probably, it is caused by another factor. Accordingly to the lowering of temperature, the percentage of surviving eggs drops to 53.64% at 11° and to 18.18% in 8°. In the lowest experimental temperature, namely in 5° only 7.00% of eggs survive. It is very characteristic, that the optimum of survival in constant temperatures lies in such high temperature as 20°. In high temperatures the eggs are resistant only in the case of absolute stability of temperature. On the other hand all fluctuations cause high mortality. With changing of temperatures the optimum of survival lies much lower, in 11°—91.00%. In the range of 11°—20° small fluctuations (ampl. 6°) do not cause high mortality. When the mean basis of fluctuations goes up the mortality goes up too, but it remains beneath 50% up to 21°. Larger fluctuations (ampl. 12°) allow the survival above 50% in a little range of 11°—19°.

The optimum of survival in case of these fluctuation lies in 14° — 88.32%. In the higher amplitude (18°) the range of 50%

is smaller extending from 11°—17°. Their optimum lasts up to 14°, but the value of survival is a little larger: 91·12%, than that of the corresponding smaller amplitude combination. Only in one temperature (14°) the experiments of 24° amplitude were conducted. The results are not of any larger ecological value, then survival being only 45·69%.

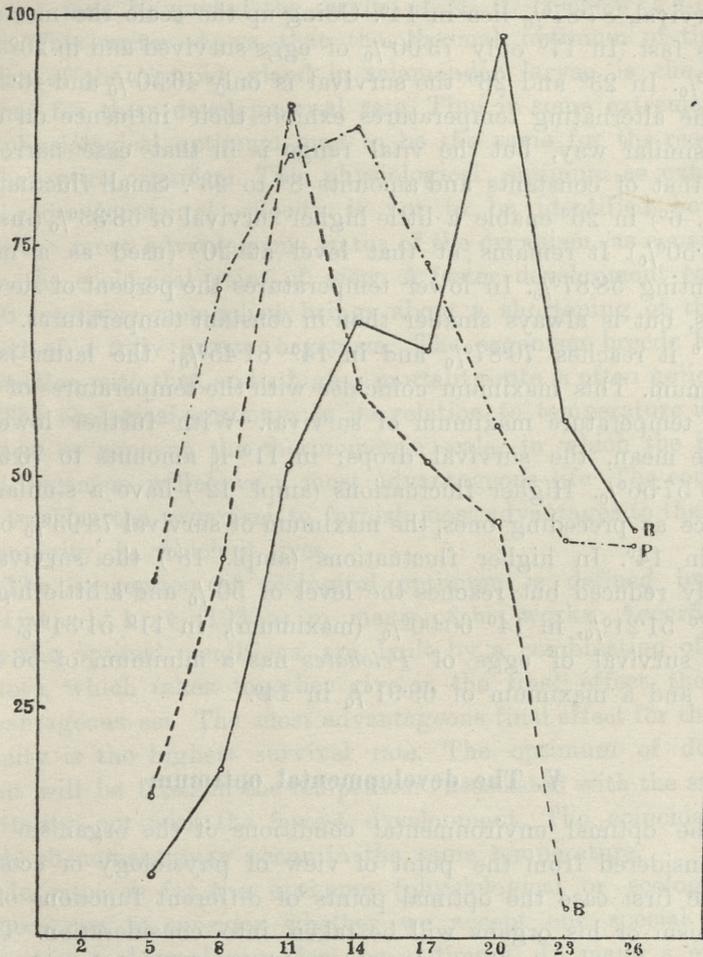
The largest mean survival (calculated for combinations with different amplitudes) in alternating temperatures is fixed between 11° and 14°. This shifting of survival optimum of alternating temperatures is evident if compared to that of constant temperatures; it concerns only this experimental species.

The range of survival of developing eggs of *Bufo bufo* is narrower than that of the other species. In constant temperatures, beginning with 23° the survival is only 3·17%. In 20° it reaches 45·29%. Slight above 50%—51·69% is the survival of 17°. Further increase of survival percent is parallel with dropping temperatures and in 11° it reaches its optimum 90·24%. Lower temperatures cause a new diminution of survival: in 8° — 41·42%, in 5° 15·43%. The optimum lies in the vicinity of the temperature, which frequently is the mean temperature of the air in the breeding time of *Bufo*.

The alternating temperatures have a special influence on the survival of eggs of *Bufo*. In case of small fluctuations (ampl. 6°) they do not change the rate of development. The range in which the survival is higher than 50% is broader, expanding from 7° to 19°. Already in 8° the survival is 65·91%, in 11° 84·25% and in 14° it reaches its optimum 92·00%. Going up the scale of the temperatures the survival drops again: in 17° to 72·57%, in 20° to 43·68%, and in 23° to only 10·00%.

The stronger fluctuations (ampl. 12°) show some other influence. Maximum of survival lies between 8° and 11°; it is almost the same in both temperatures mentioned above: 91·71% and 91·60%. With raising temperatures, it drops again and with the margin temperature of 20° it amounts to 66·14%. The alternating temperatures of 18° amplitude give a similar survival as these of the preceding ones. The maximum lies in 11° and the survival drops down to 52·50% in 20°. With the fluctuations of 24° two results were obtained: in the mean temperature of 14° the survival of 68·49% and in that of 17° the survival of 19·79%.

The mean calculated survival in alternating temperatures shows that the optimal survival of eggs of *Bufo bufo* lies in the same temperature (11°) as the optimum in constant temperatures (the difference of *Rana*).



Textfig 4. The survival of the eggs of experimental species in constant temperatures. — *Rana temporaria*, ---- *Bufo bufo*, - · - · - *Pelobates fuscus*. Ordinates the percent of survival, abscissae the temperatures.

The results of experiments with the eggs of *Pelobates fuscus* shows their great power of resistance. The survival was relatively very high. In constant temperatures the range of high survival

varied from 5° to 26°. The lowest survival, 38·51% was observed in the temperature of 5°. When compared to other species, the amount of eggs which survive is very large. The percent grows fast reaching 70·42% in 8°, and 84·87% in 11°. The maximum of survival, 87·87% lies in 14°. Going up the scale the mortality grows fast. In 17° only 73·00% of eggs survived and in 20° only 55·59%. In 23° and 26° the survival is only 46·50% and 46·40%.

The alternating temperatures exhibit their influence on eggs in a similar way, but the vital range is in that case narrower, than that of constants and amounts 8° to 23°. Small fluctuations (ampl. 6°) in 26° enable a little higher survival of 58·33% (instead of 46·50%). It remains at that level at 20° (used as a mean) amounting 58·87%. In lower temperatures the percent of survival grows, but is always smaller than in constant temperatures. Thus in 17° it reaches 70·87% and in 14° 81·45%; the latter is the maximum. This maximum coincides with the temperatures of constant temperature maximum of survival. With further lowering of the mean, the survival drops; in 11° it amounts to 76·68%, in 8° 57·56%. Higher fluctuations (ampl. 12°) have a similar influence as preceding ones, the maximum of survival 78·93% being also in 14°. In higher fluctuations (ampl. 18°) the survival is greatly reduced but reaches the level of 50% and a little higher. In 17° 51·21%, in 14° 60·00% (maximum), in 11° 51·31%. The mean survival of eggs of *Pelobates* has a minimum of 56·45% in 8° and a maximum of 69·91% in 14°.

## V. The developmental optimum

The optimal environmental conditions of the organism may be considered from the point of view of physiology or ecology. In the first case the optimal points of different functions of the organism or his organs will be taken into consideration. There are many works dealing with this subject, the results of which show, that the optimal temperature is such a temperature, in which the given reaction goes fastest. Most of the physiological functions are accelerated with a raising temperature. This acceleration grows to a definite temperature, and then the reaction begins to slow again. This top temperature is easy to be determined by an experiment. It is accepted as a physiological opti-

mum of the given function. In most cases it approaches the upper vital limit of an animal (Davidson 1931 and others).

It happens sometimes, that the physiological thermal optima are common to several physiological functions of an organism. As such may be quoted the results of M. H. Hartwigs (1936) work. This writer shows, that the thermal optimum of the excretion of the thyroid gland in salamander larvae is the same as that for their developmental rate. Thus in some extreme cases the physiological optimum may to be the same for the reactions of the entire organism. This physiological optimum as exhibited in the developmental velocity is not to be identified however with the most advantageous status of the organism, as considered from the ecological point of view. A faster development causing a too intensive metabolism brings about a shortening of the life period of a fully grown organism. The organism breeds less in connection with that, and a higher mortality-rate is often noticeable.

The ecological optimum in its relation to temperature is such a point or zone on the thermometric scale, in which the individual organism will have a most advantageous life. The course of life enables the organism to furnish most advantages to the biotic community, in which it lives.

The conception of ecological optimum is defined by Koshantschikov (1933a) in many of his works. According to him the optimal conditions are built by a combination of those factors, which taken together give in the final effect the most advantageous set. The most advantageous final effect for the community is the highest survival rate. The optimum of development will be fixed in the temperature associated with the smallest mortality, not with the fastest development. The coincidence of both phenomena may occur in the same temperature.

In research for the optimum (physiological or ecological) it is necessary to consider whether we accept one special temperature or a thermal zone for the optimum. In many an entomological publication it is stated, that the optimal temperature is this, in which the smallest individual fluctuation may be observed. In our results no difference of fluctuation range was observed. Tyler (1936) proved this problem on physiological experiments. He studied the respiration of embryos within the vital thermal range and he could not find any temperature in which a espe-

cially small amount of oxygen would be used. This allows us to presume, that the biological (ecological) optimum is rather a zone on the scale, than one defined temperature. The experiments presented above show, that in case of constant temperature the maximal survival temperature is not identic with that of maximal rate of development. Such a phenomenon was observed in all the experimental species. For *Rana* these temperatures lie near each other. The optimum of survival in  $20^{\circ}$  and that of developmental velocity in  $23^{\circ}$ . In *Bufo* the optimal survival is achieved in  $11^{\circ}$ , that of velocity in  $21.5^{\circ}$ . The difference is as high as  $10^{\circ}$ . Also the eggs of *Pelobates* show the divided optima: that of survival on  $14^{\circ}$ , that of developmental rate in  $24.5^{\circ}$ .

When considering the survival of embryos in alternating temperatures we see, that the mean survival of *Rana temporaria* lies in another temperature, than in case of constants ( $11^{\circ}$  instead of  $20^{\circ}$ ). The comparison with the curves of developmental time, shows the optima of survival coinciding with the crossing points of the curves. In the temperature of the upper crossing ( $20^{\circ}$ ), lies the optimum of survival in constant temperatures and in the vicinity of the lower crossing ( $14^{\circ}$ ) the survival optimum of the alternating temperatures.

In case of *Bufo bufo* the mean survival of both, alternating and constant temperatures lies in the same point ( $11^{\circ}$ ). The comparison to the curves of time temperature shows a different behaviour of *Bufo* embryos. The optimal temperature of the survival does not agree with the crossing points of the curves, but lies within the range margined by them.

The eggs of *Pelobates fuscus* behave analogically to the eggs of *Bufo*. The optimum of survival (for both kinds of temperatures) lies in  $14^{\circ}$ . This is inside the range margined by the crossing points ( $7^{\circ}$  and  $17^{\circ}$ ) of the curves.

Considering the presented phenomena, we approach the problem of the eury- and steno-thermism of the eggs. The separation of the optima in *Rana temporaria* must be stressed here. This is a sign of the possibility of adaptation. The optimal points lie in those mean temperatures the fluctuations of which do not cause the changes of the rate of development. The eggs' capacity for regulation may be so great, that such a strong reaction, as acceleration or retardation of the development of the whole or-

ganism is not necessary. This type of behaviour is the mark of eurythermism. The range of the thermometric scale extending between the crossing points (*Rana* 13.5°—19.5°) in which we observe the little acceleration of development should be called the optimal range. The shortening of developmental period, if not too large, may be advantageous from the ecological point of view.

The eggs of *Bufo bufo* have the optimum of survival (in both kinds of temperatures) lying low enough (11°) and within the optimal range. This range is marked out by the points of crossing on curves. These lie in 7° and 17°. In the optimal range the developmental rate is larger. Analogically we call this range a zone of ecological optimum.

The optimum of the survival of the eggs of *Pelobates fuscus* is found in 14°. The optimal range (with accelerations of the development) is expanded as that of *Bufo* (7°—17°). The optimum of the survival is closer to the upper limit of the optimal range (3°), than in the case of former species (6°). Both species react similarly, having the optimum of survival placed within the optimal range.

The interpretation of the vital optimum, mentioned above, agrees with its conception formulated by Koshantschikov (1933 a). The position of the survival optimum within the optimal range points out a highly developed stenothermism (*Bufo*, *Pelobates*) and the position of two optima on the margins of this range is the mark of eurythermism (*Rana*).

## VI. The vital optimum, phenology and geographical distribution

The physiological and ecological constitution may effect the phenomenon of phenology and also that of geographical distribution. The phenology of frogs and toads' breeding is closely related to the climatic conditions. *Rana temporaria* which has the eurythermic eggs spawns in early spring and never repaets the spawning. The breeding season of *Bufo bufo* and *Pelobates fuscus*, and also of some other species depends according to Juszczuk (1937) to rainfall, and often is repeated in late spring and early summer. It is clear, that in this case the eggs are submitted to the influence of low and high temperature. The greatest fluctuations of temperatures are observable in early spring.

The differences in developing periods of particular species are small, the mean difference lies in the way of behaviour towards alternating temperatures (described in chapter III and IV).

The physiological constitution depends rather on ecological niche of an animal, or typical conditions of geographical area of certain species, than on their systematic position. Let us take for example the fact that *Bufo americanus* Le Conte (Mikulski 1936), the species closely related to *Bufo bufo* behave differently in its natural conditions. *Bufo americanus* lays eggs in April (in the locality of the investigated individuals, Middle Illinois) when the mean monthly temperature is ca 17°. The vital range of eggs of *Bufo americanus* reaches from 10° to 30°. The observed optimum is 15° and the part of the scale, in which the acceleration of the development is found 15°—26°. The developmental period is in those two species of the genus *Bufo* also different. In 20° *B. americanus* develops in 112·35 hours, whereas *B. bufo* develops in 78 hours. The differences between those two closely related species of one genus appear to be greater, than those of the European representatives of separate families. There are also some differences in the vital range of the genus *Rana*. That range in constant temperatures is for *R. temporaria* L. 5°—26° (Europe), and in *R. pipiens* (N. America) is extended to 32° (A. Mayer 1935).

The problem of geographical differences in physiology of marine animals has been recently treated in the works of H. Munro Fox (1936—37). It was discovered that some Crustaceans of the same species living in different geographical latitudes may exhibit a different rate of physiological processes. The same rule is also stated by Spärck (1936) in connection with his experiments with the Molluscs of different ecological type of life and geographical distribution. The present experiments with amphibian eggs (as compared to the former) let us suppose, that this rule is applicable also to the poikilothermic Vertebrates especially in stage of eggs.

### Summary

1. The periods of the development of eggs of *Rana temporaria*, *Bufo bufo* and *Pelobates fuscus* in constant temperatures differ very little.

2. The thermal vital range is for *Rana* 2°—26°, for *Bufo* 2°—28°, for *Pelobates* 2°—26°. Those temperatures acting constantly, the be normally developed.

3. The curves of time-temperature (in constant temp.) are very similar to the chain curves of Janisch. The same shape shows the curves of the influence of alternating temperatures, but they are slightly shifted in the scale.

4. The influence of alternating temperatures appears as a retardation in the extreme ranges, or as an acceleration in the development, in the optimal range. These ranges are margined by thermal points in which the alternation of temperature does not change the rate of development. They lie in 14° and 20° for *Rana*, in 7° and 17° for *Bufo*, in 7° and 17° for *Pelobates*.

5. In experiments with constant temperatures the maximal survival is placed for *Rana* in the temperature of 20°, in the temperature of 11° for *Bufo*, in the temperature of 14° for *Pelobates*. The maxima of mean survival in alternating temperatures lie for *Rana* between 11° and 14°, for *Bufo* in 11° and for *Pelobates* for 14°. The optima of *Rana* lie on the margins of the optimal range, and those of *Bufo* and *Pelobates* inside of them.

6. The eggs of *Rana* show the eurythermic structure and those of *Bufo* and *Pelobates* a stenothermic one.

7. We may state on the basis of comparative study, that the physiological constitution of frog eggs (as shown in their behaviour towards temperatures) accords with the natural conditions of animal life and not with their systematic relationship.

The work was carried on in the Zoological Department of the Jagellonian University of Cracov. I am indebted to the Director of the Department, Professor M. Siedlecki for his personal interest in my investigations and his valuable suggestions.

---

### Literature

- 1) Andersen K. Th., 1930. Die Abhängigkeit der Herzschlagzahl und der Atembewegungen bei Knochenfischen von der Keimlingsgrösse und der Temperatur. *Zeit. vergl. Physiol.* **11**: 56—103. — 2) Brandt H., 1936. Die Abhängigkeit der Bewegungsgeschwindigkeit der Nonnenraupe (*Lymantria monacha* L.) von der Temperatur. *Zeitschr. vergl. Physiol.* **13**: 715—720. — 3) Castelnovo G., 1932. Azione differenziale della temperature sulle uove di Axolotl. *Bol. Zool.* **3**: 291—298. — 4) Davidson J., 1931. The influence

- of temperature on the incubation period of the eggs of *Sminthurus viridis* L. Austrial. J. exper. Biol. **8**: 143—152. — 5) Dean J. L. and Tazelaar M. A., 1928. The effect of a temperature gradient on the early development of the Frog. Brit. J. exper. Biol. **5**: 309—336. — 6) Godlewski E., 1900. Die Einwirkung des Sauerstoffes auf die Entwicklung von *Rana temporaria* und Versuch der quantitativen Bestimmung des Gaswechsels in den ersten Entwicklungsstadien. Arch. Entw. Mech. Org. Bd. **11**: 585—616. — 7) Gray J., 1928., The Growth of fish. II. The growth-rate of the embryo of *Salmo fario*. Brit. J. expt. Biol. **6**: 110—124. — 8) Gray J., 1928 b ditto. III. The effect of temperature on the development of the eggs of *Salmo fario*. ibidem **6**: 125—130. — 9) Hartwig H., 1936. Über die Beziehungen zwischen Schilddrüse und Entwicklung bei Salamanderlarven unter dem Einfluss verschiedener Temperaturen. Arch. Entw. Mech. **134**: 562—587. — 10) Hecht G., 1931. Winterschlaf und Paarungsdaten deutscher Amphibien. Sitzber. Ges. nat. Freunde Berlin Jhrg. 1930.: 316—329. — 11) Janisch E., 1927. Das Exponentialgesetz als Grundlage einer vergleichenden Biologie. J. Springer, Berlin. — 12) Janisch E. 1925. Über die Temperaturabhängigkeit biologischer Vorgänge und ihre kurvenmässige Analyse. Pflügers Arch. gesamm. Physiol. **209**. 414—436. — 13) Janisch E., und Abdel Aziz Ali Elsayed G h a b n. 1932. Über den Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf die Entwicklung junger Seidenraupen. Arb. Biol. Reichsanst. Land. Forstwirtsch. **20**: 245—257. — 14) Juszczyk Wł., 1937. O porze godowej naszych płazów bezogonowych. Spraw. Kom. Fizj. Pol. Akad. Um. **71**: 131—145. — 15) Kaufmann O., 1932. Einige Bemerkungen über den Einfluss der Temperaturschwankungen auf die Entwicklungsdauer und Streuung bei Insekten und seine graphische Darstellung durch eine Hyperbel. Zeitschr. Morph. Ökol. **25**: 355—361. — 16) Kozhantschikov J. W., 1933. Zur Frage nach dem Temperaturoptimum des Lebens. I. Individuelle Wärmeregulation der Insekten. Zool. Anz. **103**: 30—35. — 17) Kozhantschikov J. W., 1933 a. ditto. II. Über die Temperaturabhängigkeit einzelner physiologischer Prozesse und ihre Beziehung auf das Lebensoptimum des Organismus. Zeitschr. angew. Entom. **20**: 591—610. — 18) Kozhantschikov J. W. und Maslowa E., 1935. ditto. IV. Über die Totalmenge des verbrauchten Sauerstoffes während der Puppenmetamorphose. Zool. Jahrb. Abt. Physiol. **55**: 219—230. — 19) Kozhantschikov J. W., 1936. ditto. V. Über die Beziehung der Entwicklungsgeschwindigkeit zum vitalen Optimum bei Insekten. Zeitschr. angew. Entom. **22**: 452—462. — 20) Kozhantschikov J. W., 1936 a. ditto. VI. Über die physiologische Bedeutung der Wärmesumme bei Insekten. Zool. Anz. **113**: 7—13. — 21) Kozhantschikov J. W., 1936 b. ditto. VII. Physiologisches Kriterium des Steno- und Eurythermie der Insekten. Zool. Journal Moskwa. **15**: 217—244. — 22) Kowajiczi Minoru., 1934. Influence of variation of water temperature on the development of eggs and fry of salmon and trout. Proc. 5th Pacific Sci. Congr. (Canada) **5**: 33—60. — 23) Lechler H., 1931. Über den Einfluss des Temperaturwechsels auf das Schlüpfen und einige andere Fragen der Erbrütung. Schweiz. Fisch. Zeit. **39**: 155—162. — 24) Leiner M., 1932. Die Entwicklungsdauer der Eier des dreistacheligen Stichlings in ihrer Abhängigkeit von der Temperatur. Zeitschr. vergl. Physiol. **16**: 591—605. — 25)

Mayer Atlas, 1935. The effect of temperature on the development of *Rana pipiens*. *Physiol. Zool.* **8**: 290—310. — 26) Mikulski J., 1936. The influence of alternating temperatures upon the development of the amphibians, *Bufo americanus* Le Conte and *Ambystoma tigrinum* Green. *Bull. Acad. Pol. Sc.* 1936. *Cl. Sc. Mat. Nat. Série B II.* 245—266. — 27) Samassa P., 1896. Über die äusseren Entwicklungsbedingungen der Eier von *Rana temporaria*. *Verh. Deutsch. Zool. Ges. VI. Versamml.* 93—97. — 28) Savage R. M., 1935. The influence of external factors on the spawning date and migration of the common frog *Rana temporaria* Lin. *Proc. Zool. Soc.* 1935. 49—98. — 29) Shelford V. E., 1927. An experimental investigation of the relations of the Codling moth to weather and climate. *Bull. Ill. Nat. Hist. Surv.* **16**: 307—340. — 30) Sizer I. W., 1936. Stimulation of *Fundulus* eggs by oxalic and malonic acids and breathing rhythm as functions of temperature. *Journ. gen. Physiol.* **19**: 693—714. — 31) Tazelaar M. A., and Huxley J. S., 1930. Some effects of an antagonistic temperature gradient upon the frogs egg. *Anat. Rec.* **47**: 1—10. — 32) Tyler A., 1936. On the energetics of differentiation. III. Comparison of the temperature coefficients for cleavage and later stages in the development of the eggs of some marine animals. *Biol. Bull.* **71**: 59—81. — 33) Tyler A., 1936 a. ditto. IV. Comparison of the rates of oxygen consumption and of development at different temperatures of eggs of some marine animals. *ibidem.* 82—100. — 34) Voute A. D., 1936. Die Entwicklung der Mehlmotte *Ephestia kuehniella* Zell. bei konstanter und schwankender Temperatur. I und II. *Zeitschr. angew. Entom.* **22**: 1—25, 165—184. — 35) Wells N. A., 1935. The influence of temperature upon the respiratory metabolism of the Pacific Killifish, *Fundulus parvipennis*. *Physiol. Zool.* **8**: 196—227. — 36) Wood A. M., 1932. The effect of temperature on the growth and respiration of fish embryos. *J. expt. Biol.* **9**: 271—276. — 37) Yamamoto Takaharu, 1935. Influence of the sudden change of water temperature on the carp fry. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **3**: 349—354.

---



*Czynniki wpływające na długość trwania ciałka żółtego. —  
Über die Lebensdauer der gelben Körper und die sie be-  
einflussenden Faktoren<sup>1)</sup>.*

Mémoire

de MM. **S. SKOWRON** et **Z. WICIŃSKI**,

présenté le 10 Janvier 1938 par M. E. Godlewski m. t.

In einer früheren Publikation<sup>2)</sup> haben wir bewiesen, daß gegen Ende der Schwangerschaft und nach der Geburt in den gelben Körpern des Kaninchens charakteristische degenerative Veränderungen auftreten, welche leicht unter Benutzung einer mikroskopischen Technik, die die Fettsubstanzen in den Luteinzellen nicht vernichtet, beobachtet werden können. Diese Veränderungen sind aus einem Zusammenfließen der Fettröpfchen zu größeren Tropfen ersichtlich, welche letztere oft die ganze Luteinzelle ausfüllen, wobei die Zellen selbst kleiner werden, während sich in den Fettmassen vakuolenähnliche Gebilde zeigen, deren Inhalt gar nicht oder nur schwach mit Sudan färbbar ist (Textabb. 1 und 2). Die Vakuolen sind Glieder des Zerfallsprozesses der Fettsubstanzen in den Luteinzellen, die schließlich entweder endgültig degenerieren oder auch als interstitielle Zellen in das Gewebe des Ovars einverleibt werden. Gleichzeitig mit diesen Veränderungen erscheinen kurze Zeit nach der Geburt Fetttropfen in den Zellen der Septen, welche die Luteinzellen voneinander abgrenzen und in den Zellen der *Theca externa*. Auf diese degenerativen Veränderungen in den Zellen des gelben Körpers gestützt, die unserer Ansicht nach ein sichereres Anzeichen seiner hormonalen Inakti-

<sup>1)</sup> Ausgeführt mit Unterstützung des Tyszkowski-Fonds.

<sup>2)</sup> S. Skowron und T. Keller. Zeitschr. f. Zellforsch. u. mikr. Anat. B. 21, 1934.

vierung sind als die Veränderungen in der Größe und Blutversorgung, kamen wir zu der Annahme, daß beim Kaninchen der gelbe Körper die ganze Schwangerschaftsperiode hindurch, d. h. 30 Tage, tätig ist. Die regressiven Veränderungen werden nämlich erst nach der Geburt deutlich beobachtet und die Entfernung der gelben Körper ruft bei dieser Tierart sogar gegen Ende der Schwangerschaft eine Frühgeburt hervor, was auch ein Zeichen ihrer anhaltenden Tätigkeit ist. Im Gegensatz zu den gelben Körpern der Schwangerschaft zeigen die gelben Körper der Pseudoschwangerschaft, die mittels des sterilen Koitus hervorgerufen



Textabb. 1 u. 2. Luteinzellen 2 Tage nach der Geburt. Die vakuolisierten Fettmassen füllen die Zellen fast gänzlich aus. Nach Skowron und Keller.

wird, analoge Veränderungen schon viel früher. Die Pseudoschwangerschaft dauert beim Kaninchen zirka 17 Tage, denn erwiesenermaßen übt so lange die Sekretion des gelben Körpers einen sichtbaren Einfluß auf die Schleimhaut des Uterus aus, auch fällt die Regression der Fettsubstanzen im gelben Körper ungefähr in diese Zeit<sup>1)</sup>. Am 19 Tage der Pseudoschwangerschaft kann man also in den gelben Körpern Veränderungen wahrnehmen, die denen ähnlich sind, welche zwei Tage nach der Geburt in den gelben Körpern der Schwangerschaft auftreten. Da sowohl der Bau als auch die Entwicklung der gelben Körper in der normalen und in der Pseudoschwangerschaft gleich sind, lag der Schluß nahe, daß der Unterschied in der Lebensdauer wahrscheinlich von dem erhaltenen schwangeren Uterus abhängt. Diese Vermutung erwies sich als richtig, da nach einem Abortus in kurzer Zeit eine Regression der gelben Körper eintritt. Die Anwesenheit der Föten im Uterus allein spielt jedoch keine größere Rolle,

<sup>1)</sup> A. Peraus. Bull. de l'Acad. Pol. Cl. de Méd. 1936.

da, wie das Klein<sup>1)</sup> bewiesen hat, die Entfernung der Föten unter gleichzeitiger Erhaltung der Plazenten keine Degeneration der gelben Körper hervorruft. Klein kommt beim Besprechen seiner Ergebnisse zu dem Schluß: »l'activité fonctionelle du corps jaune pendant la deuxième moitié de la grossesse est conditionnée à son tour par un facteur émané du complexe placenta — parois utérines«. Es muß hinzugefügt werden, daß die gelben Körper von Kaninchen, welchen der Uterus, noch ehe sie reif wurden, entfernt worden war, nach Asdell und Hammond ungefähr 10 Tage länger dauern als die gelben Körper der Pseudoschwangerschaft bei Tieren mit erhaltenem Uterus<sup>2)</sup>. Diese Verfasser stützten sich jedoch in ihren Untersuchungen auf Messungen des Durchmessers der gelben Körper, aus denen sie dann Schlüsse über die Aktivität zogen. Wenn man dagegen die Veränderungen in der Verteilung der Fettsubstanzen berücksichtigt, so zeigt es sich, daß die Lebensdauer der gelben Körper durch eine operative Entfernung des Uterus zwar verlängert wird, aber nur um 3—4 Tage (Skowron und Keller)<sup>3)</sup>. Im Zusammenhang mit diesen Angaben ist auch beachtenswert, daß das Follikelhormon auf die gelben Körper nicht nur nicht regressiv wirkt (Skowron und Peraus)<sup>4)</sup>, sondern, daß es dieselben sogar, wie dies Allen und Heckel nachgewiesen haben, während der Pseudoschwangerschaft beim Kaninchen bis zu 25 Tagen nach dem Koitus am Leben erhält<sup>5)</sup>.

In der vorliegenden Arbeit beabsichtigen wir die Ursachen genauer zu untersuchen, von denen die Unterschiede in der Lebensdauer der gelben Körper während der normalen und der Pseudoschwangerschaft beim Kaninchen abhängen und den Versuch anzustellen die bisherigen Ergebnisse über den Einfluß der Plazenta, des Follikelhormons und der Hysterektomie in Einklang zu bringen. Ein Anzeichen für die beginnende Regression der gelben Körper sahen wir in der veränderten Verteilung der Fettsubstanzen in den Luteinzellen, in den Zellen der Septen und in den Zellen der *Theca externa*.

1) M. Klein. Arch. d'Anat. d'Histol. et d'Embryol. T. XVIII. 1934.

2) S. A. Asdell a. J. Hammond. Amer. Journ. of Physiol. v. 103. 1933.

3) S. Skowron et T. Keller. Bull. Soc. Sexol. T. III. 1936.

4) S. Skowron et A. Peraus. Compt. Rend. Soc. Biol. T. CXIX. 1935.

5) W. M. Allen a. G. P. Heckel. Science. v. 84. 1936.

Wenn man die allmähliche Regression der gelben Körper des Kaninchens nach der Geburt vergleicht, nachdem in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft der schwangere Uterus entfernt worden oder nachdem mittels größerer Dosen von Follikelhormon ein Abortus hervorgerufen worden war, so nimmt man ziemlich große Unterschiede wahr. Die Unterschiede werden durch die verschiedene Schnelligkeit, welche die regressiven Veränderungen annehmen, hervorgerufen, und nicht durch die Art und Weise, in welcher die Fettsubstanzen zerfallen. Während nämlich schon 12 Stunden nach der Geburt in den Zellen der Septen Fettropfen erscheinen, gegen den dritten Tag die Zellen der *Theca externa* mit Fett durchtränkt sind und gleichzeitig ein Teil der Luteinzellen der Rückbildung unterliegt und die in ihnen angesammelten Fettsubstanzen umgebaut werden, so erscheinen nach Entfernung des schwangeren Uterus in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft oder nach einem Abortus dieselben Veränderungen um einige Tage später. Auf jeden Fall beginnt die Degeneration der gelben Körper, welche durch Entfernung des schwangeren Uterus oder durch eine größere Dose Follikelhormon hervorgerufen wurde, noch vor dem 30. Tag, d. h. vor der Zeit, in welcher die gelben Körper unter normalen Verhältnissen ihre inkretorische Tätigkeit einstellen. Die Anzeichen der Degeneration sind nämlich schon ungefähr am 4. Tage nach Vernichtung der Föten unter dem Einfluß von Follikelhormon und nach Abspaltung der Plazenta als Folge einer durch Follikelhormon bewirkten Hyperämie sichtbar. Eine operative Entfernung des Uterus ruft eine analoge Wirkung hervor. Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, daß man die Lebensdauer des gelben Körpers der Schwangerschaft in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft sowohl durch Entfernung des schwangeren Uterus wie auch durch Hervorrufen eines Abortus und Lostrennung der Plazenten hervorrufen kann, daß jedoch die Degeneration in diesem Fall einen langsameren Verlauf nimmt als in normalen Verhältnissen, d. h. nach der Geburt. Da Klein durch seine Versuche nachgewiesen hat, daß die Entfernung der Föten allein keine Rückbildung der gelben Körper hervorruft, wenn die Plazenten an ihrer Stelle bleiben, so muß man annehmen, daß der Faktor, welcher die Funktion der gelben Körper beeinflußt, der Plazenta seine Entstehung verdankt. Auf die chemische Natur dieses Faktors weist

der Umstand hin, daß die Rückbildung nicht sofort nach Entfernung des schwangeren Uterus eintritt. Wahrscheinlich ist seine Konzentration im Blut nach der Entfernung des Uterus und Abortus einige Tage lang noch so stark, daß er Rückbildung der gelben Körper verhindert.

Wenn dieser Faktor gar nicht oder in zu kleinen Mengen vorhanden ist, so ist das unserer Meinung nach die Ursache für die frühere Rückbildung der gelben Körper in der Pseudoschwangerschaft, während bekannterweise schon ungefähr am 19. Tag nach dem sterilen Koitus charakteristische Degenerationserscheinungen im gelben Körper auftreten. Die Lebensdauer der gelben Körper, die dann entstehen, wenn man weiblichen Kaninchen Prolane aus dem Harn schwangerer Frauen injiziert, ist etwas kürzer, als diejenige der gelben Körper der Scheinschwangerschaft. Die Dauer der ersteren beträgt ungefähr 15 Tage (20 Experimente), in diesem Zeitraum kann man nämlich oft im gelben Körper den Beginn regressiver Veränderungen beobachten. Wir konnten das sowohl in den Fällen beobachten, in welchen nach der Injektion von Schwangerenharn Ovulation eintrat, als auch dann, wenn Blutergüsse in das Innere der Follikel erfolgten, welche letztere darauf luteinisiert wurden. Im Gegensatz zu den normalen gelben Körpern der Schwangerschaft und der Pseudoschwangerschaft wird in den luteinisierten Follikeln eine eher lockere Anordnung der Luteinzellen beobachtet, welche radiär angeordnet und durch starkes Bindegewebe voneinander getrennt sind. Das Innere der Follikel ist mit Blutkörperchen angefüllt, die von der Seite der Luteinzellen von Bindegewebezellen umgeben sind, welche den im Inneren des Follikels gebildeten Thrombus durchwachsen. Manchmal kann man runde Gruppen von Luteinzellen beobachten, die an der Grenze der radiär angeordneten Luteinzellen liegen und von Bindegewebe umgeben sind. Diese Luteinzellengruppen, die wir ziemlich oft beobachtet haben, scheinen sich aus einzelnen Luteinzellen zu entwickeln, die sich dann teilen und größere Ansammlungen dieser Elemente bilden, welche vom Bindegewebe umgeben sind.

In der Folge wurde die Frage aufgeworfen, ob die operative Entfernung des schwangeren Uterus in der ersten Periode der Schwangerschaft die Lebensdauer der gelben Körper, so wie das in der zweiten Periode vorkommt, zu verkürzen vermag. In allen

den Fällen jedoch, in denen den befruchteten Weibchen der Uterus zwischen dem 4—19 Tag nach dem Koitus entfernt wurde, bildeten sich die gelben Körper nicht vor dem 17—19 Tag nach dem Koitus zurück, trotzdem seit der Entfernung des schwangeren Uterus 7—13 Tage verfloßen waren. In diesem Zeitraum sollten sich nämlich die regressiven Veränderungen im gelben Körper zeigen. Auf Grund dieser Versuche glauben wir annehmen zu dürfen, daß die Lebensdauer des gelben Körpers während der Pseudoschwangerschaft mindestens 17 Tage währt und daß sich dieser Zeitabschnitt nicht durch eine Entfernung des schwangeren Uterus kürzen läßt. Auf die Dauer dieses Lebensminimums hat auch die beginnende Rückbildung der älteren gelben Körper keinen Einfluß. Es zeigte sich nämlich, daß, wenn man einige Zeit nach einem sterilen Koitus durch Injektion von Schwangerenharn das Entstehen neuer gelber Körper hervorruft, die Lebensdauer der letzteren so wie immer ungefähr 15 Tage beträgt. Jede Generation der gelben Körper macht ihren Zyklus unabhängig durch, wobei der Zyklus bei einer Pseudoschwangerschaft ungefähr 17 Tage, bei Vorkommen von gelben Körpern und Blutergüssen, die durch eine Injektion von Prolanen hervorgerufen werden, einige Tage kürzer, d. h. ungefähr 15 Tage dauert.

Unserer Meinung nach führt eine genauere Analyse der die Lebensdauer der gelben Körper beeinflussenden Faktoren zu dem Schluß, daß der Erklärungsversuch von W. M. Allen und G. P. Heckel am besten sowohl den Unterschied in der Lebensdauer der gelben Körper der Schwangerschaft im Vergleich mit den gelben Körpern der Pseudoschwangerschaft erklärt, wie auch den Einfluß des Follikelhormons und der operativen Entfernung des Uterus auf die gelben Körper der Pseudoschwangerschaft. Auf Grund ihrer Beobachtungen über den günstigen Einfluß des Follikelhormons auf die Lebensdauer der gelben Körper, kommen diese Forscher zu dem Schluß, daß die längere Dauer der gelben Körper der Schwangerschaft wahrscheinlich auf die Wirkung des in der Plazenta produzierten Follikelhormons zurückzuführen ist. Auf jeden Fall ist diese Vermutung wahrscheinlicher als der früher angenommene Einfluß der gonadotropen Hormone, die in der Plazenta produziert werden, und welche entweder unmittelbar oder über die Hypophyse hinweg auf den gelben Körper einwirken sollten. Die Verfasser betonen ausdrücklich in ihrer Mit-

teilung, daß diese letztere Vermutung »is not based on the direct evidence from the rabbit, but rather by analogy because of the finding of pituitary like substances in human pregnancy urine and placenta«. Im Licht der Hypothese von Allen und Heckel können auch die Ergebnisse der Untersuchungen von Klein leicht erklärt werden. Die Entfernung der Föten allein unter Zurücklassung der Plazenten ruft keine Rückbildung der gelben Körper hervor, weil die Plazenta auch fernerhin Follikelhormon produziert, welches die weitere Entwicklung des gelben Körpers im Gange hält. Unserer Meinung nach können sowohl die Beobachtungen von Asdell und Hammond, wie auch diejenigen von Skowron und Keller mit der Ansicht von Allen und Heckel in Einklang gebracht werden. Wenn man nämlich den Uterus operativ entfernt, kann der Teil des Follikelhormons, welcher für den Umbau der Schleimhaut gewissermaßen verbraucht wird, an den gelben Körper abgegeben werden, der dann länger dauern könnte, was auch wirklich der Fall ist. Auf jeden Fall ist eine derartige Erklärung einfacher, als die Hypothese von Asdell und Hammond, welche annehmen, daß der Hauptfaktor, der die Lebensdauer des gelben Körpers während der Schwangerschaft verlängert, das von der Hypophyse produzierte Hormon ist. Diese Verfasser sind der Ansicht, daß: »The uterus may use a certain quantity of some substance that is required by the corpus luteum for its proper functioning. If then, no uterus is present to use it, more may be spared for the corpora lutea which may be able to persist as a consequence«. Unserer Meinung nach wird der Einfluß, welchen die Entfernung des Uterus hat, besser dadurch erklärt, daß sich die Menge des Follikelhormons, welche für den gelben Körper bereit steht, vergrößert. Die Verkürzung der Lebensdauer der gelben Körper, die durch Prolane hervorgerufen werden, im Vergleich mit den gelben Körpern der Pseudoschwangerschaft kann unserer Ansicht nach auch die verminderte Produktion des Follikelhormons nach Injektionen von Prolanen erklären, die in diesem Falle kleiner ist als nach der Sekretion des gonadotropen Hormons der Hypophyse, welches letzteres, wie viele Untersuchungen zeigen, mit den Prolanen nicht identisch ist. Auf die Rolle des Follikelhormons bei der Luteinisierung des Ovariums weisen auch die letzten

Untersuchungen von Klasten<sup>1)</sup> hin, der bei erwachsenen Kaninchenweibchen durch Injektion von großen Follikelhormondosen die Entstehung gelber Körper und Luteinisierung des interstiellen Gewebes des Ovariums erreichte.

Die Ergebnisse unserer Versuche lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1) Die Lebensdauer der gelben Körper, die durch Injektion von Schwangerenharn hervorgerufen werden, beträgt ungefähr 15 Tage, während in der Pseudoschwangerschaft die gelben Körper 17 Tage lang aktiv sind. Nach diesem Zeitraum erst beginnen die regressiven Veränderungen der Fettsubstanzen.

2) Man kann während der Schwangerschaft durch Entfernung des Uterus samt den Föten das Auftreten von regressiven Veränderungen in den gelben Körpern nicht vor Ablauf von 17 Tagen nach dem Koitus hervorrufen.

3) Die Entwicklung neuer gelber Körper im Ovar hat keinen Einfluß auf die Dauer der früheren.

4) Die Hypothese von Allen und Heckel, welche einen Einfluß des Follikelhormons auf die Dauer der gelben Körper annehmen, erläutert am besten sowohl den Einfluß, den die Entfernung der Plazenta ausübt, wie auch die Wirkung des Follikelhormons und der operativen Entfernung des Uterus auf die Lebensdauer der gelben Körper.

Aus dem Biologisch-Embryologischen Institut der Jagellonischen Universität in Kraków (Leiter: Prof. Dr E. Godlewski).

---

<sup>1)</sup> E. Klasten. Zentralbl. f. Gynäkol. J. 61. N. 19. 1937.

*Wpływ surowicy krwi na ruchliwość plemników koguta. —  
The Influence of the Serum upon the Motility of Spermatozoa of the Domestic Cock<sup>1</sup>).*

Mémoire

de MM. Z. GRODZIŃSKI et J. MARCHLEWSKI,

présenté le 7 Mars 1938 par M. H. Hoyer m. t.

**The Problem and Methodes Employed**

A number of factors exerts a deciding influence upon the motility of cock's spermatozoa, obtained from the ejaculated sperm and kept outside the organism of the bird. Among others, the temperature, the quality of the solution with which the ejaculated sperm was diluted, and the degree of dilution, play an important part. In our former paper we had stated that the spermatozoa diluted in a relation 1:10 and kept in temperature of +2°C, preserve their motility much longer, than when diluted more strongly or kept in higher temperature. Of the six diluting solutions investigated, namely: Tyrode fluid, Yamane & Kato fluid at pH 7.7, blood serum, blood plasma, embryonic extract and hen's egg albumen, we recognized hen's blood serum, besides Yamane & Kato fluid, as a most suitable habitat in which the spermatozoa keep their motility for the longest period of time.

From the literature we know that the investigators vary in their opinion concerning the influence of serum upon spermatozoa. Some, like Kölliker, Hirokawa and Gawrilow found that serum of the same species, and even that of other species is a diluting solution favourable to the motility of spermatozoa of the mammals. According to Bederke, every serum affects

<sup>1</sup>) This research work was performed thanks to pecuniary aid of the »Tyszkowski Fund« of the Polish Academy of Sciences.

dog's spermatozoa very disadvantageously. Bernstein and Lazareff observed a temporary, for 24 hours lasting agglutination of bull's spermatozoa in a fresh serum of animals of both sexes of the same species. Among the invertebrates the blood of the molluscs *Katharina tunicata* agglutinates spermatozoa of some sea urchin (Sampson). Granzow in his investigations conducted on a large scale could not find in the serum of the same species any elements toxic to man's or guinea pig's spermatozoa. However, the serum proved to be a poor dilutor, its quality stood in a certain connection with the physiological state of the donor.

In face of these differences of opinion, we, repeated during two seasons of the year 1936 and 1937 our experiments with cock's spermatozoa and hen's serum on a larger material; later on we tried the influence of serum of a number of other birds, as well as of reptiles, amphibians, fishes and mammals, upon the same sort of spermatozoa. Finally, we took into consideration the dependence which seems to exist between the motility of spermatozoa and the sex of the donor of serum.

Cock's semen was obtained, like in the former investigations, on applying the method of Nikitin, that is from ejaculations collected in a rubber pouch, and kept in glass tubes. Two cocks lived separately each in his own coop. We were careful to collect the semen every day and if possible at the same time of the day. The time of the stay of spermatozoa in the epididymis was in the majority of cases approximately 24 hours. Due to this fact we obtained material of uniform vitality. As Krzyszkowski and Pawlow maintain, the spermatozoids ejaculated after a longer sexual interval, preserves their motility for a much longer time, than after a short interval.

Blood for the serum was taken by means of a syringe immediately from the heart of birds and mammals without narcosis. Amphibians and reptiles were being previously narcotised with ether. The blood of unnarcotised fishes came from blood vessels of the gills or of the tail. After 24 hours stay in an ice box at a temperature of  $+2^{\circ}\text{C}$ , the blood was centrifuged for 10—15 minutes with a speed of 3300 revolutions a minute. We collected the serum by means of a pipette into glass tubes which were always sterilized and provided with an inner coating of hard paraffine. The glass tubes were sealed with wax-paper heated upon a gas flame.

For our experiments we mixed the semen with the serum in a relation 1:10, if possible immediately after collection. The solution of the semen was preserved in a temperature of  $+2^{\circ}\text{C}$ . The samples of this solutions taken every 24 hours or more frequently, were investigated under the microscope in a hanging drop. We estimated the motility of spermatozoa no sooner than after having heated the sample for 10—15 minutes in a thermostat at a temperature of  $+37^{\circ}\text{C}$ . As some serum were reddened with the haemoglobin dissolved in them, we made a pure and strongly reddened serum of the same sample of blood. The effect of experiments with both kinds of serum did not show any greater differences, which fact is in accordance with the observations of Granzow.

In the graphs, like in our former paper, is represented besides the conditions of the experiment, also the degree and kind of the motility of spermatozoa. In the rectangles, a spot totally black represents the progressive movement, a dotted one oscillatory movement, and the areas totally white denote immobility. The size of space of each of the mentioned signs, approximately corresponds to the quantity of spermatozoa, which exerted the movement, denoted by this kind of the sign.

#### Hen's serum

We obtained serum of 15 hens. Nine of these hens were White Leghorns imported from England in 1931 and belong to the same stock as the experimental cocks. The age of the hens varied from 2—4 years. One was a Bantam, one a Polish Greenfoot and four scrubs of no particular breeding. The influence of serum of each donor upon the spermatozoa was investigated 2—6 times but in the majority of cases 3 times. The graph Nr. 1 represents the mean results and exceptionally in one case the optimal result.

The above graph illustrates the results obtained. The experiment Nr. 33 we shall for the time exclude from discussion, because this hen showed a masculine sexual behaviour. The rest of the experiments points to the fact that cock's spermatozoa, coming from the ejaculation preserve motility in the serum of hen during periods of different length, the range of which varies between 24—192 hours. The time of duration of the progressive and the oscillatory movement is also variable. The serum of brooding hens

has the same qualities as that of the layers. From the above, the conclusion might be drawn that the serum of different hens possesses certain individual qualities, due to which it influences the motility of spermatozoa of the same cock in a various way.

No.	Date	Ser. Nr.	Sp.	10'	24 <sup>h</sup>	48 <sup>h</sup>	72 <sup>h</sup>	96 <sup>h</sup>	120 <sup>h</sup>	144 <sup>h</sup>	168 <sup>h</sup>	192 <sup>h</sup>	216 <sup>h</sup>	Remarks
24	30.VI.	28.	A+C.	■	■	■	■	■	■	■	■	■	□	layer
32	11.VI.	125.	A+C.	■	■	■	■	■	■	□				„
3	23.V.	1.	B.	■	■	■	■	■	■	□				„
155	1.VI.	III.	A.	■	■	■	■	□	□					„
37	15.VI.	129.	A.	■	■	■	■	□						„
36	1.VI.	5.	A.	■	■	■	■	□						„
15	11.VI.	6.	A+C.	■	■	■	■	□						„
19	25.VI.	12.	A+C.	■	■	■	■	□						„
26	27.VI.	282.	A+C.	■	■	■	■	□						brooder
170	12.VI.	II.	A.	■	■	■	■	□						„
158	5.VI.	I.	A.	■	■	■	■	□						layer
29	11.VI.	98.	A+C.	■	■	□								„
5	9.VI.	3.	A+C.	■	■	□								„
8	8.VI.	4.	A+C.	■	■	□								„
33	16.VI.	31.	A+C.	■	□									„cock-hen”

Graph Nr. 1. Hen's Serum

Without subjecting these peculiarities to a detailed analysis, we may confirm Granzow's data. He stated that the vitality of spermatozoa of the guinea-pig in the serum of females of the same species, pregnant and not pregnant, diluted with Ringer fluid, varies within wide limits (10'—32 h 20'). The serum of females on the first day after the delivery seems to be a comparatively most advantageous dilutor. Man's sperm survives in the serum of women in different periods of their sexual life on the average for a longer time than in the former experiments, also the range of the fluctuation is not so great. This is perhaps in connection with the quality of the spermatozoids, as guinea-pig sperm was obtained from the epididymis, and that of the man

came from the ejaculation. Among others it was Redenz, who called attention to the fact that the spermatozoa of mammals acquire in the epididymis some qualities which make them highly resistant to the various influences of the environment in which they may find themselves afterwards.

### The Heterologous Serum

The experiments conducted similarly with cock's spermatozoa and the serum of pheasants, guinea-fowl and pigeons, gave results represented on Graph Nr. 2.

No.	Name	Date	Se.	Sp.	5'	15'	24 <sup>h</sup>	48 <sup>h</sup>	72 <sup>h</sup>	96 <sup>h</sup>	120 <sup>h</sup>	148 <sup>h</sup>	172 <sup>h</sup>
39.	Phasianus colchicus	15. VII.	♀	A+B	■	■	■	■	■	■	■	■	■
42.		"	♀	"	■	■	■	■	■	■	■	■	■
47.	Numida meleagris	13. VII.	♀	"	■	■	■	■	■	■	■	■	■
45.		"	♀	"	■	■	■	■	■	■	■	■	■
151.	Numida meleagris	1. VIII.	♂	A	■	■	■	■	■	■	■	■	■
50.		7. VIII.	♀	A+C	■	■	■	■	■	■	■	■	■
48.		"	♀	"	■	■	■	■	■	■	■	■	■
76.	Columba livia (domestica)	23. IV.	♂		■	■	■	■	■	■	■	■	■
52.		15. IV.	♀	A	■	■	■	■	■	■	■	■	■
92.		29. V.	♂		■	■	■	■	■	■	■	■	■
80.		12. V.	♀		■	■	■	■	■	■	■	■	■
97.		29. V.	♂		■	■	■	■	■	■	■	■	■
91.		"	♂		■	■	■	■	■	■	■	■	■

Graph Nr. 2. The Serum of other Birds

The influence of the heterologous serum of birds upon the motility of spermatozoa of the cock gives no uniform picture. Namely the serum of pheasants and guinea-fowls, therefore of birds, which together with the cock belong to the same systematic group (*Familia-Phasianidae*), influences the spermatozoa similarly to the serum of hen of the same species. Here also individual variability of serum is denoted, due to which the duration of motility of spermatozoa varies within quite vast limits (48 h — 148 h). Domestic pigeon which belongs to a different order (*Ordo-Phapes*) than the domestic hen, possesses serum which altogether checks the motility of spermatozoa within a few minutes at the latest. An exception forms the case Nr. 76 in which a small

percentage of spermatozoa preserved the ability of oscillatory movement for 120 hours.

Our experiments with pigeons confirm the data given by Granzow, concerning the influence of serum of women and horses upon the movements of spermatozoa of guinea-pig. In this case the serum of the representatives of the order *Primates* and *Ungulata*, checks in a short time the movements of spermatozoa of the representative of the order *Rodentia*.

In order to complete our knowledge concerning the importance of the heterologous serum for the motility of spermatozoa, we provided the serum of vertebrates of systematical groups more distant from the *Familia-Phasianidae* and *Ordo-Phapes*, and we extended our investigations to the *Classis-Mammalia*, *Reptilia* and *Pisces*. This kinds of sera we mixed with the semen of the same cocks, making one experiment with each donor of serum. The results contradicted all suppositions based upon the systematical relationship of proteins (Graph Nr. 3). The serum of mammals and reptiles proved detrimental to the motility of spermatozoa, in spite of the fact that these classes of animals form together with birds a systematical group of *Amniota*. The serum of amphibians and fishes, especially that of the species *Salamandra* and *Leuciscus*, proved to be a much better diluting fluid for the spermatozoa of the cock, but even in the best cases (48 h — 72 h) it did not surpass the serum of own species and that of the members of the *Phasianidae* (192 h — 148 h). This would prove that the foreign protein of serum is of great importance to the vitality of spermatozoa but that it is not the sole and absolute cause which checks their motility.

### The Serum of Cocks and Capons

On the ground of results obtained by Granzow and concerning the serum of castrats and male individuals as donors of semen, we undertook similar investigations in our material, hoping that in this way we shall be able to throw a new light upon the problems of interest for us.

With the serum of two cocks (A and B) who were the donors of semen in the experiments described above, we diluted their own semen. In the course of fourteen days we made 16 experiments which brought quite an unexpected effect Namely

No.	Name:	Date:	Se.	Sp.	5'	15'	2 <sup>h</sup>	5 <sup>h</sup>	24 <sup>h</sup>	48 <sup>h</sup>	72 <sup>h</sup>	96 <sup>h</sup>	120 <sup>h</sup>
102	<i>Ovis aries.</i>	4.V.	♂	A									
103		"	♂	B									
105	<i>Oryctolagus cuniculus.</i>	5.V.	♀	A									
106		"	♀	A									
83.	<i>Lacerta agilis.</i>	14.V.	♀	?									
84.		"	♀	?									
81.	<i>Anguis an.</i>	"		?									
82.	<i>Vipera ber.</i>			?									
88.	<i>Salamandra salamandra.</i>	22.V.	♀	?									
89.		"	♂	?									
56.	<i>Rana temporaria.</i>	30.IV.		?									
57.		"	9.IV.		?								
65.		"	14.IV.	♂	?								
66.		"	16.IV.	♂	?								
62.	<i>Rana esculenta.</i>	15.IV.	♂	A									
63.		"	♀	A									
64.		"	♀	A									
67.	<i>Bufo vulgaris.</i>	17.IV.	♂	?									
68.		"		?									
77.		"	27.IV.	♂	B								
78.		"		♂	B								
72.	<i>Perca fluviatilis.</i>	21.IV.	♂	B									
73.		"	♂	B									
74.		"		B									
75.		"	♂	B									
70.	<i>Leuciscus rutilus.</i>	18.IV.		A									
71.		"		A									
78.		"	24.IV.		B								
79.		"			B								

Graph Nr. 3. The Serum of other Vertebrates

in 14 cases agglutination of spermatozoa followed either immediately or within a few minutes. The agglutination may be recognized with the naked eye, by white spots scattered on the background of the transparent drop of serum, spread over the covering glass. Under the microscope one sees that the spots consist of many motionless spermatozoa clustered together. There was no progressive movement in any of the cases, only in three of them the spermatozoa moved with oscillatory movement for several hours. The process of agglutination proved to be irreversible phenomenon, not even after 24 hours.

It was only in two cases out of 16 experiments that no agglutination took place (Graph Nr. 4). The progressive movement of

No.	Date.	Ser.	Sp.	5'	10'	15'	6 <sup>h</sup>	24 <sup>h</sup>	48 <sup>h</sup>	72 <sup>h</sup>
100	2.VI.	A	A							
99	1.VI.	A	B							
108	7.VI.	A	A							
110	9.VI.	A	A							
120	10.VI.	A	A							

Graph Nr. 4. The Serum of Cocks

a small number of spermatozoa lasted for 24 hours, and afterwards the oscillatory movement was prolonged to 48 hours in the more conspicuous case. Thus, also in these cases the motility of spermatozoa were subject to certain restriction, if compared with the experiments with hen's serum.

An immediate agglutination of the spermatozoa followed also, as we had opportunity to state for several times, in the serum of hen (Nr. 31). We bought this hen for the Institute already as two years old one, in the year 1934, and in that year during two months between May 6 and July 8 she laid ten yolkless eggs. She laid no more eggs during the following three years. In the same time her instincts changed, she ceased to chuckle, tried to tread hens, etc. In one word, she became a »cock-hen«. This happens to some individuals, in consequence of disturbances in the ovary, due to tumour or tuberculosis (Parkes & Brom-

bell, Cole & Lippincott). The reaction of the serum of our »cock-hen« became like that of cock's serum (Graph Nr. 1, Nr. 33).

These experiments brought us upon the supposition that the agglutination of spermatozoa in the serum, may in a certain degree depend on the sex of the donor of serum. This ought have been proved on the capons. For this purpose we used the serum of two White Leghorn Capons. Eleven experiments made during 28 days in May and June gave the same result. Namely in four possible combinations of two different serum and two different semen, the spermatozoa preserved their motility from 72—168 hours. (Graph Nr. 5).

Nr.	Date	Capon	Sp.	15'	24 <sup>h</sup>	48 <sup>h</sup>	72 <sup>h</sup>	96 <sup>h</sup>	120 <sup>h</sup>	144 <sup>h</sup>	168 <sup>h</sup>	192 <sup>h</sup>
86.	23.V	35	B									
87.	20.V	35	A									
85.	22.V	65	B									
118.	14.VI	65	A									

Graph Nr. 5. The Serum of Capons

In the light of the above investigations the conditions among the birds would show different than those among the mammals. Granzow proved that serum of guinea-pig is for its own semen and for semen of another individuals a better dilutor, than Ringer fluid. On the other hand the serum of castrated ♂ and ♀ individuals, and ♂ with ligated seminal duct, works in a distinctly checking manner on the movement of spermatozoa.

### Agglutination of Spermatozoa <sup>1)</sup>

The phenomenon of agglutination of spermatozoa is known of old, as well as the fact that the process may have different strenght and durability. Also a number of factors was stated, by which this phenomenon is evoked. Lillie found that a water extract of eggs of the *Arbatia* and *Nereis* temporally agglutinates their own spermatozoa. These observations were confirmed upon a different material by Loeb and Sampson. Godlewski evoked agglutination of spermatozoa of sea urchins by egg or sper-

<sup>1)</sup> We thank Dr. J. Heller for his critical remarks and advices, which he gave us while working out this problem.

matozoa extract of other species. Also mixing up the semen of representatives of two systematically distant groups ends in agglutination, e. g. *Echinus* and *Sipunculus*. A number of chemical compounds, as: diluted chromic acid (Kölliker),  $\text{CO}_2$  (Lillie, Kalwaryjski),  $\text{FeCl}_3$  (Yamane, Gellhorn), or various salts of Pb, Al, (Gellhorn), La, Ce (Gray), agglutinate spermatozoa of vertebrates and invertebrates.

The agglutination observed by us may be brought down to that kind of phenomena which have a serological background. In connection with this we must suppose that the cock's semen contains agglutinogen and his serum a corresponding agglutinin.

Several investigators (Ardelt, Yamakami, Kraińska-Ignatowa, Landsteiner & Miller, Steusing) stated, that the spermatozoa of mammals belong to the same serological group as the red corpuscles of blood of the donor of the spermatozoa, then they possess the same agglutinogens. The serological group structure of the bird's spermatozoa is up till now unknown. In result of our experiments one should ascribe to the semen the possession of some agglutinogen, but nothing can be said about its relation to similar substances in the erythrocytes. Thanks to the works of Wiener, Thomson, Schütt, Hirschfeld & Halber and Herman, we know the serological picture of hen's blood quite well. In any case there exist in the blood of a majority of hens various agglutinins.

Further investigations aimed at changing this serological structure of cock's semen and serum, accepted by us theoretically. We caused these changes by suitably heating the substances under investigation.

We destroyed the agglutinins by heating the serum in a thermostat at  $+50^\circ\text{C}$ . for one hour. The agglutinogen contained in the semen might be present either in the seminal fluid or in the spermatozoa only, therefore it ought have been sought for in both components of the semen. With this purpose we diluted the semen with Yamane & Kato fluid in a relation 1:10, afterwards we centrifuged it for 10 minutes at 3300 revolutions. By means of a pipette we drew off the fluid collected in the glass test-tube above the semen, and heated it in the same manner as the serum. We poured the seminal fluid treated in that way on the centrifuged spermatozoa. The semen thus obtained and containing living

spermatozoa was regarded in the experiment as heated one. In order to settle if there is agglutinogen in spermatozoa, we washed them three times in Yamane & Kato fluid, each time centrifuging and removing the fluid taken for washing. The washed spermatozoa we preserved in Yamane & Kato fluid for a short time before using them in experiment. Spermatozoa of the ejaculation excellently bear the process of centrifuging, their vitality does not lose much by it. In this respect they differ from the spermatozoa which come from the epididymis and which, according to Granzow, are very susceptible even to slight shocks.

No.	Date.	Ser.	Sp.	10'	3 <sup>h</sup>	16 <sup>h</sup>	40 <sup>h</sup>	64 <sup>h</sup>	88 <sup>h</sup>	112 <sup>h</sup>	136 <sup>h</sup>
141	23.V.	A	A <sub>50°</sub>								
140	"	A <sub>50°</sub>	A <sub>50°</sub>								
139	"	A <sub>50°</sub>	A								
142	"	A	A								

Graph Nr. 6. Heated Semen and Serum

Having at our disposal the serum and semen (i. m. spermatozoa in seminal fluid), both heated and normal, we mixed them together in four possible ways. Agglutination took place only when both components were not heated. In the rest of cases, spermatozoa preserved their motility for approximately 90 hours (Graph Nr. 6). Thus it appears that the substances, taking part in the agglutination, are very heat-labile.

We made a similar series of experiments with washed spermatozoa. To three different mixtures of seminal fluid and serum [and namely serum heated × seminal fluid unheated, serum unheated × seminal fluid heated, both heated] and to unheated serum we added 4—7 minutes after preparing mixtures washed spermatozoa. Agglutination did not take place in any of these cases, not even in the one, in which washed spermatozoa came in contact with unheated serum (Graph Nr. 7). This experiment proves that the adhesion of the eventual agglutinogen to the surface of spermatozoa is very weak one, it can be easily washed away. It is some evidence that it is a component of seminal fluid; the planned series of experiments have to settle it.

After having proved that the cock serum may be deprived of the agglutinating qualities by suitable heating, we tried what would be the result of heating pigeons serum. It is true, that cock's spermatozoa do not agglutinate in the pigeon's serum in a manner optically visible, they only very quickly lose their motility. Cock's spermatozoa moved in the serum of two pigeons,

No.	Date.	Ser.	Seminal fluid	Sperms	30'	24 <sup>h</sup>	48 <sup>h</sup>	72 <sup>h</sup>	96 <sup>h</sup>	120 <sup>h</sup>	148 <sup>h</sup>
149.	30. V.	A	A <sub>50°</sub>	rinned							
150.	"	A	—								
147.	"	A <sub>50°</sub>	A								
148.	"	A <sub>50°</sub>	A <sub>50°</sub>								

Graph Nr. 7. Washed Spermatozoa

heated in the above described manner, for 96 and 120 hours, while spermatozoa in the control experiment, set in at the same time, lost their motility after a few minutes. These observations confirmed the investigations of Bernstein and Lazareff, who stated that the inactivation of cattle's serum, by heating it for 1 h at +55°C., destroys its agglutinating qualities.

### Summary

Cock's spermatozoa preserve their motility in the serum of hens, pheasants and guinea-fowls for a period of time of different length (24 h — 192 h), dependent on the individual peculiarities of the serum, but independent from the circumstance whether the donor lays eggs or broods.

In the serum of pigeons, several kinds of mammals and reptiles, the movement of spermatozoa ceases very soon, but unexpectedly in the serum of some teleost fishes and amphibians it continues for a longer time (96 h).

The serum of two cocks used for experiments and of the »cock-hen« agglutinated cocks spermatozoa; capons serum proved to be a diluting fluid favourable to their motility.

The authors suppose that this agglutination has a serological ground, because one can prevent agglutination by a suitable heating of serum or seminal fluid.

Substances taking part in the agglutination are heat-labile. The adhesion of the agglutigen to the surface of spermatozoa is very weak; agglutigen is probable a component of seminal fluid.

Institute of Comparative Anatomy of Jagellonian University, Kraków.

---

### Literature

1. Ardelt F. Erzeugung von temporärer Sterilität beim weiblichen Kaninchen durch Spermatoxine. Arch. Gynäkol. 145. 1931. — 2. Bederke G. Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Konservierungsmethoden auf die Vitalität von Hundespermien. Arch. Tierer. u. Tierzucht 9. 1933. — 3. Bernstein A. & Lazareff H. Über den Einfluß des Blutes auf die Lebenstätigkeit der Spermatozoen. Orenburg vet. Institut 73. 1933. — 4. Cole L. J. & Lippincot W. A. The Relation of Plumage to Ovarian Condition in a Barred Plymouth Rock Pullet. Biol. Bul. 36. 1919. — 5. Gavrillov K. Die Vitalität der Rattenspermatozoen in Leber-, Nieren- und Milzextrakten. Biol. Gen. 11. 1935. — 6. Gellhorn E. Beiträge zur vergleichenden Physiologie der Spermatozoen. II. III. Pflügers Arch. 193. 1922; Godlewski E. Inhibition réciproque de l'aptitude à féconder des spermatozoïdes éloignés comme conséquence de l'agglutination des spermatozoïdes. Arch. Biol. 36. 1926. — 7. Godlewski E. Über die Agglutinationserscheinungen der Echinidensamenfäden unter dem Einfluß der aus fremdartigen Geschlechtselementen gewonnenen Substanzen und deren Fähigkeit die Sistung des Entwicklungsganges herbeizuführen. Bul. Acad. Cracovie 1930. — 8. Godlewski E. Nouvelles recherches sur l'hétéroagglutination des spermatozoïdes et sur l'action d'extraits de cellules sexuelles d'espèces étrangères. Arch. Biol. 45. 1934. — 9. Granzow J. Biologische, serologische und pharmakologische Untersuchungen an den Spermien des Meerschweinchens und des Menschen. Arch. Gynäkol. 148. 1932. — 10. Gray J. The Relation of Spermatozoa to Certain Electrolytes. Proc. Roy. Soc. B. 91. 1920. — 11. Grodziński Z. & Marchlewski J. Studies on the Motility of Spermatozoa of the Domestic Cock Outside the Organism. Bull. Acad. Sc. Cracovie 1935. — 12. Heller V. G. & Pursell L. Chemical Composition of the Blood of the Hen During its Life Cycle. J. Biol. Chem. 118. 1937. — 13. Herman W. Hämatologische Studien an den polnischen Hühnern der Rasse »Zielononózka« (Hühner mit grünen Füßen). Spraw. Dośw. Zootech. Warszawa 1936. — 14. Hirokawa W. Über den Einfluß des Prostatasekretes und der Samenflüssigkeit auf die Vitalität der Spermatozoen. Biochem. Zeitschr. 19. 1909. — 15. Hirschfeld L. & Halber W. Über gegenseitige Beziehungen gruppenspezifischer Strukturen bei Menschen und Tieren. Zeitschr. Immunitätsf. 59. 1928. — 16. Kalwaryjski B. Über Samenfädenagglutination unter Einwirkung chemischer Agenzien. Biochem. Zeitschr. 169. 1926. — 17. Kölliker A. Physiologische Studien über

5\*

die Samenflüssigkeit. Zeitschr. wiss. Zoolog. 7. 1856. — 18. Krzyszkowsky K. N. & Pawlow G. N. Beiträge zur Biologie der Spermatozoen. Zeitschr. Tierz. Züchtbiol. 10. 1927. — 19. Landsteiner K. & Miller C. P. On Individual Differences of the Blood of Chickens and Ducks. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 21. 1924. — 20. Lillie F. R. Studies of Fertilisation. V. The Behaviour of the Spermatozoa of Nereis and Arbacia with Special Reference to Egg-extracts. J. Exper. Zool. 14. 1913. — 21. Loeb J. Cluster Formation of Spermatozoa Caused by Specific Substances from Eggs. J. Exper. Zool. 17. 1914. — 22. Löw O. Die Chemotaxis der Spermatozoen im weiblichen Genitaltrakt. Sitzb. Akad. Wien III. 111. 1902. — 23. Nikitin M. W. Artificial Insemination in the Fowl. Probl. Zhiwotn. 9. 1932. — 24. Parkes A. S. & Brambell F. W. R. The Anomalous Appearance of Male Sexual Characters in Female Fowls. J. Genet. 17. 1927. — 25. Popa G. T. & Marza V. D. Biologie des spermatozoïdes. Arch. roum. pathol. expér. 4. 1931. — 26. Redenz E. Versuch einer biologischen Morphologie des Nebenhodens. I. und II. Arch. mikr. Anat. Entwickl. 103. 1924. und Arch. Entw. Mech. 106. 1925. — 27. Sampson M. Iso-agglutination and Heteroagglutination of Spermatozoa. Biol. Bull. 43. 1922. — 28. Schmidt A. & Eck H. Zur Gruppenspezifität der Spermatozoen. D. Z. gericht. Med. 22. 1933. — 29. Schütt G. Über das Vorkommen von Blutgruppen bei Hühnern. Diss. Hannover 1929/30. — 30. Steusing Z. Classification sérologique des spermatozoïdes humains. C. r. Soc. Biol. Paris 103. 1930. — 31. Thomsen O. Untersuchungen über erbliche Blutgruppenantigene bei Hühnern. Hereditas 22. 1936. — 32. Walton A. Studies on the Physiology of Reproduction. I. The Flocculation of Sperm Suspensions in Relation to Surface. Brit. J. Exper. Biol. 2. 1924. — 33. Wiener A. G. Individuality of the Blood in Higher Animals. II. Agglutinogens in Red Blood Cells of Fowles. J. Genet. 29. 1934. — 34. Yamane J. Studien über die physikalische und chemische Beschaffenheit des Pferdespermas mit besonderer Berücksichtigung der Physiologie der Spermatozoen. Hokkaido Imp. Univers. Sapporo. 9. 1921.

*Naczynia krwionośne w skórze śluzicy (Myxine glutinosa L.). — Über die Blutgefäße der Haut von Myxine glutinosa L.*

Mémoire

de M. M. HANS et de M<sup>lle</sup> Z. TABENCKA,

présenté le 7 Mars 1938 par M. H. Hoyer m. t.

Der Verlauf der Blutgefäße im Integument der Fische wird im hohen Maße durch die Anwesenheit von verschiedenen Gebilden, wie Hautzähnen, Knochenschildern und Schuppen beeinflusst, indem die Gefäße durch diese Gebilde abgelenkt werden und nur Nebenäste und Kapilarnetze an dieselben abgeben. Die Haut des Schleimfisches ist einfacher gebaut und enthält außer den in zwei Reihen angeordneten Schleimsäcken keine anderen Gebilde. Daraus wäre zu schließen, daß auch die Blutgefäße in derselben eine sehr einfache Anordnung haben müssen. Außerdem wäre noch zu untersuchen, in welchem Verhältnis die Blutgefäße der Haut zum Lymphgefäßsystem stehen. Cole zählt nämlich im Körper der *Myxine* einige Stellen auf, an denen sich das Blut direkt aus den Blutgefäßen in die »roten Lymphgefäße« ergießt. Es wäre also erstens festzustellen, wie sich das Blutgefäßsystem in der Haut von *Myxine* verhält und ferner ob eine Verbindung der Blutgefäße der Haut mit den unterhalb der Haut liegenden Lymphsäcken vorhanden ist.

Zur Untersuchung dienten Schleimfische, die in Bergen (Norwegen) gefangen worden sind<sup>1)</sup>. Ihre Adern waren mit schwarzer Tusche oder Berlinerblau injiziert. Die Hautausschnitte ver-

<sup>1)</sup> Das Material wurde mit Unterstützung des »Fundusz Kultury Narodowej Józefa Piłsudskiego« gesammelt.

schiedener Körpergegenden durchleuchteten wir in Zederholzöl. Ausgewählte Abschnitte, an denen die Adern deutlich sichtbar waren, zeichneten wir unter Abbe'schem Zeichenapparat. Auf den Schnitten, die aus diesen Hautstücken verfertigt wurden, konnte man das Verhältnis der Gefäße zu den verschiedenen Hautschichten verfolgen.

### Bau der Haut.

Die Haut der *Myxine* setzt sich, wie bei anderen Wirbeltieren, aus der Epidermis, Kutis und Subkutis zusammen. Zwischen den kleinen Zellen, welche die mehrschichtige Epidermis bilden, kann man zwei Typen von Drüsenzellen von größeren Dimensionen unterscheiden (Abb. 1. A.).

Die Kutis (Abb. 1. B.) ist ein dichtes Fasergewebe, in welchem die Fasern ziemlich regelmäßig und parallel zur Hautoberfläche verlaufen. Senkrecht zur Hautoberfläche verlaufende Fasern gibt es nur wenige. Die Subkutis (Abb. 1. C.) besteht aus einem lockeren Netz von Bindegewebsfasern und Fettzellen.

Die einzelnen Hautschichten sind scharf voneinander geschieden, wobei ihre Berührungsflächen völlig eben sind und auch zwischen Epidermis und Kutis keine Papillen, die für die höheren Wirbeltiere charakteristisch sind, vorhanden sind (Abb. 1.). Das Dickenverhältnis der drei Hautschichten stellt sich folgendermaßen dar (Abb. 1. A. B. C.).

Epidermis . . .	75 mikr. . .	23·3%
Kutis . . . . .	97 » . . . .	30·1%
Subkutis . . . .	150 » . . . .	46·6%
<hr/>		
zusammen . . .	322 mikr. . .	100·0%

In der Haut befinden sich die bereits von Müller beschriebenen Hautschleimsäcke. Sie beginnen in der Kopfgegend und verlaufen in zwei Reihen angeordnet an dem lateroventralen Rande des Körpers kaudalwärts. Im Schwanz verschieben sich die beiden Reihen nach unten und kommen in der ventralen Mittellinie miteinander in Berührung. Die Größe und Gestalt der Säcke ist, abhängig von der Körpergegend, sehr verschieden, es kommt jedoch in beiden Reihen nur ein Sack in jedem Myomer vor. Der Hals des Sackes mit dem Ausführungskanal steht in der Kutis und Epidermis, während der Sack selbst in der Unterhaut gelegen (Abb. 2.) und mit der Körpermuskulatur verwachsen ist.

Die Schleimsäcke vermitteln also die Befestigung der Haut am Körper. Außerdem wird die Haut mit dem Körper noch längs in der Mittellinie des Rückens durch eine dünne Bindegewebsslamelle verbunden. Im übrigen befinden sich zwischen der Haut

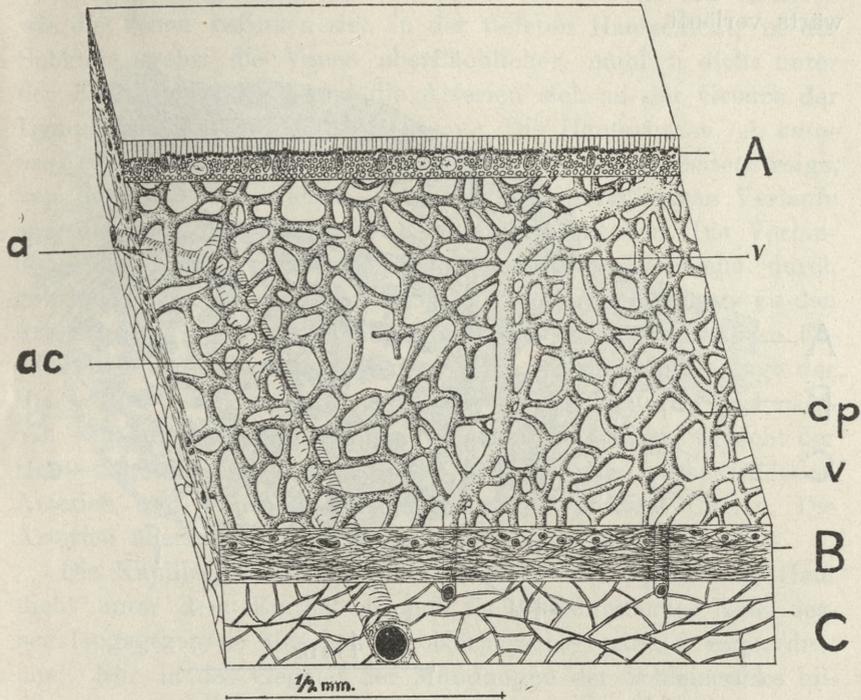


Abb. 1. Hautausschnitt aus der Gegend dicht oberhalb der Schleimsäcke. Die Gefäße wurden räumlich dargestellt.

und den Muskeln große Lymphsäcke, zwei seitliche und ein ventraler. Der schmale ventrale Lymphsack liegt zwischen den beiden Drüsenreihen, die seitlichen Lymphsäcke nehmen dagegen die Körperseiten oberhalb der Schleimsäcke ein (Müller, Cole, Grodziński).

#### Gefäße der Haut.

Die Segmentalgefäße, welche in den einzelnen Myosepten, d. h. zwischen je zwei benachbarten Myomeren verlaufen, stehen mit der *Arteria carotis*, der Aorta, bzw. mit den *Vv. cardinales*

und *Vv. jugulares* in Verbindung. Gewöhnlich befinden sich in einem Myoseptum eine Segmentalarterie und in darauffolgenden eine Segmentalvene. Jedes Segmentalgefäß teilt sich in zwei Äste, von denen der eine seitlich zur Chorda und dem Rückenmark dorsalwärts, der andere dagegen unter dem Peritoneum ventralwärts verläuft.

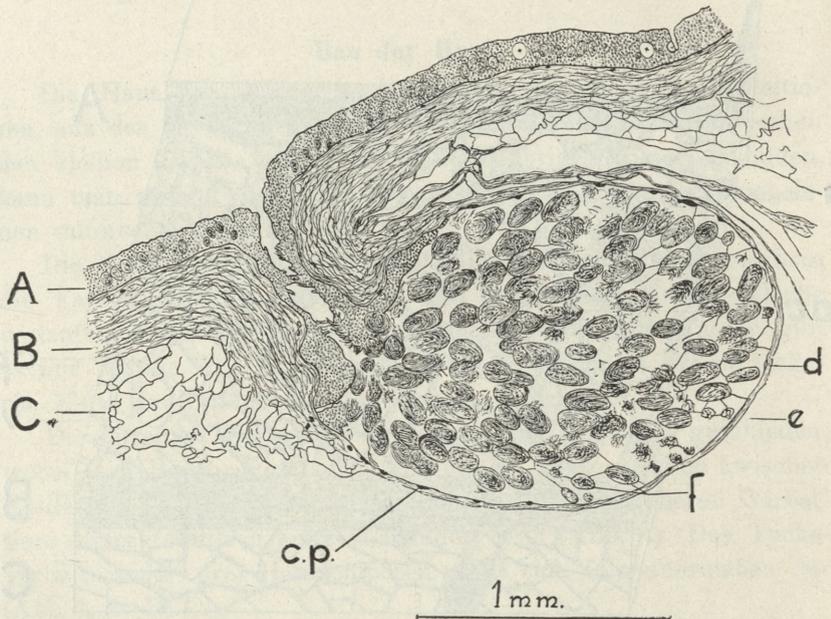


Abb. 2. Querschnitt eines Schleimsackes. Darstellung der Hautschichten. Bau eines Sackes und seiner Gefäße.

Die Fortsetzungen der dorsalen Äste der Segmentalgefäße versorgen fast die ganze Haut, indem sie durch die erwähnte Bindegewebslamelle die Medianlinie der Rückenhaut erreichen. Dasselbst verzweigen sie sich seitlich in die nach links und rechts umbiegenden Äste und werden dadurch zu Hautarterien und -venen (Abb. 1. ac.). Die ventralen Äste der Segmentalgefäße erreichen in ihrem Verlaufe die Schleimsäcke und umflechten sie mit ihren Zweigen.

Die Hauptgefäße der Haut (*A. u. V. cutanea*, Abb. 1. u. Abb. 3. ac.) sind also Fortsetzungen der Segmentalarterien oder Venen und als solche sind sie auch metamer angeordnet; auf jedes Metamer

entfält also eine *A.* oder *V. cutanea*. In der Haut verlaufen sie senkrecht zur Körperachse von der Rücken- nach der Bauchseite des Körpers zu. Die Stämme der erwähnten Hautgefäße verlaufen einander parallel, wobei der Lauf der Venen wellig und der Arterien geradlinig ist (Abb. 1. u. 3. ac. v.). Sowohl die Arterien wie die Venen befinden sich in der tiefsten Hautschicht, in der Subkutis, wobei die Venen oberflächlicher, nämlich dicht unter der Kutis liegen, während die Arterien sich an der Grenze der Lymphsäcke ausbreiten (Abb. 1. ac. v.). Die Hautarterien (*A. cutanea*) senden nicht zahlreiche (Abb. 1. ac.), aber lange Seitenzweige, von dem der Körperachse parallelen und geradlinigen Verlaufe aus, die an ihren Enden in Kapillaren übergehen. Die Verbindung der Kapillarnetze mit den *V. cutaneae* geschieht durch gewundene Seitenzweige (Abb. 1. v. 2. v.), die im Gegensatz zu den Arterien im ganzen Verlaufe Kapillaren aufnehmen. Diese Erscheinung hängt wahrscheinlich von der verschiedenen Lage der Venen und der Arterien in der Haut ab; die letzteren sind nämlich von den Kapillargefäßen durch eine viel dickere Schicht der Haut abgetrennt (Abb. 1. 3. cp.). Von den sich entsprechenden Arterien und Venen besitzen letztere ein stärkeres Lumen. Die Arterien übertreffen sie dagegen durch ihre Wanddicke.

Die Kapillargefäße bilden im Bereiche der eigentlichen Haut dicht unter dem Epithel ein sich flach ausbreitendes Netz, dessen längsgezogene Maschen der Körperachse parallel angeordnet sind. Nur in der Gegend der Mündungen der Schleimsäcke bilden sie einen dichteren Gefäßkranz (Abb. 3. u.), der sich auch auf den Hals des Schleimsackes fortsetzt und mit dem Kapillarnetz des Schleimsackes in Verbindung tritt.

Die ventralen Äste der Segmentalgefäße versorgen die Schleimsäcke. Sie verlaufen in den Myosepten dicht unter dem Peritoneum (Abb. 4. as. vs); auf der Höhe der Schleimsäcke gibt jedes von ihnen ein unpaares Gefäß (Abb. 4. a. v.) ab, welches auf der dem Peritoneum zugewandten Seite des Sackes verläuft.

Hier teilen sie sich in einige (2—3) dünne Zweige auf, die auf die Säcke übergehen. Die Arterien verlaufen dabei auf der Oberfläche des Sackes zickzackförmig und lösen sich auf ihrem Wege mittels kurzer Äste in ein Kapillarnetz auf. Das Bild der Arterie läßt sich durch eine an mehreren Stellen gebrochene Linie darstellen. Die Venen, die sich auch oberflächlich ausbreiten,

weisen einen wellenförmigen Verlauf auf. Sie stehen ähnlich wie in der Haut mit allen benachbarten Kapillaren in Verbindung. In den Myosepten vereinigen sich die Venen zweier benachbarter Säcke zu einer starken Vene, welche sich von dort auf die Hautseite der Säcke richtet und in die Segmentalvene mündet (Abb. 4. vs.) Die Kapillargefäße bilden auf der Oberfläche der

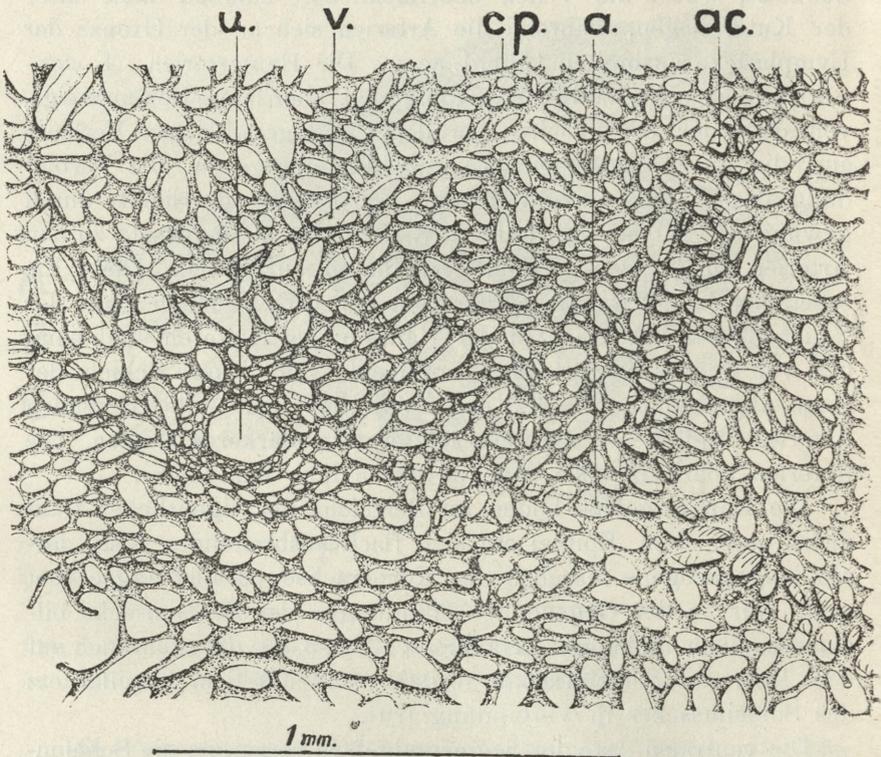


Abb. 3. Hautgefäße aus der Gegend der Mündungen der Schleimsäcke.

Schleimsäcke ein Netz, ins Innere der Säcke dringen sie aber nicht ein (Abb. 2. cp.), was insofern merkwürdig ist, als die Größe der Schleimsäcke meistens in Millimetern angegeben wird. Das Kapillarnetz besitzt Maschen von verschiedener Größe und Gestalt. Das Gefäß, welches die Masche bildet, verläuft geradlinig oder wellenförmig.

Sowohl auf den Schleimsäcken als auch in der Haut selbst gehen die Arterien in Kapillargefäße und diese selbst in Venen

über. Man sieht weder auf Gesamtpräparaten noch auf Mikrotomschnitten irgendwelche Verbindungen dieser Gefäße mit den unter der Haut gelegenen Lymphsäcken. Beide Systeme, sowohl das Blut- als auch das Lymphgefäßsystem, sind im Bereich der Haut vollkommen voneinander getrennt.

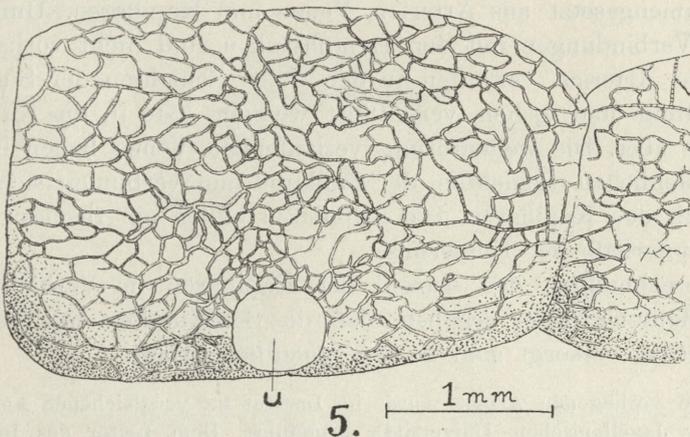
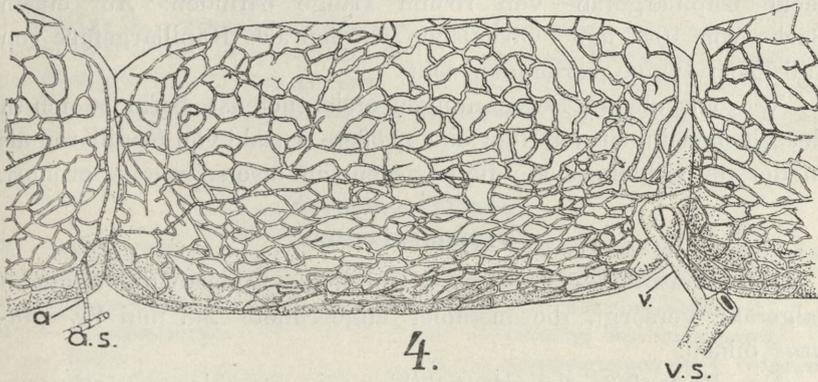


Abb. 4. Blutgefäße der Schleimsäcke, Medialansicht.

Abb. 5. Blutgefäße der Schleimsäcke, Lateralansicht.

Da die Kapillargefäße der Haut sich einschichtig und sehr regelmäßig ausbreiten, kann ihre Anzahl in der Haut ziemlich genau berechnet werden. Man mißt dabei die Länge dieser Gefäße einiger Körpergegenden in einer Flächeneinheit und multipliziert ihre durchschnittliche Länge mit der Hautoberfläche. Bei fünf Messungen, die an der Haut eines und deselben Tieres ge-

macht wurden, erreichte die Länge der Kapillaren 34·24 mm auf 1 mm<sup>2</sup> der Hautoberfläche. Die Hautoberfläche eines 29·8 cm langen Tieres beträgt 109·54 cm<sup>2</sup>, die sie durchdringenden Kapillargefäße haben also eine Länge von 3750·65 cm. Ähnliche Berechnungen zeigen, daß sich in 1 mm<sup>2</sup> der Oberfläche der Schleimsäcke Kapillargefäße von 15 mm Länge befinden. Auf einem Sacke von 104·5 mm<sup>2</sup> Oberfläche würden also Kapillargefäße von 156·75 cm Länge vorhanden sein.

Wie aus obigen Berechnungen ersichtlich ist, befindet sich in der Flächeneinheit der Haut eine größere Anzahl von Kapillaren als in der der Schleimsäcke; die letzteren sind also schwächer ernährt.

### Zusammenfassung.

Die Haut der *Myxine* wird durch die Endäste der Segmentalgefäße versorgt, die metamer angeordnete *Aa.* und *Vv. cutaneae* bilden.

Die Blutgefäße der Haut bilden ein geschlossenes System, zusammengesetzt aus Arterien, Venen und Kapillaren. Unmittelbare Verbindungen mit den Lymphsäcken sind nicht vorhanden.

Die Arterien verlaufen in den tiefen Schichten der Subkutis geradlinig und gehen vermitteltst weniger Äste in die Kapillargefäße über. Die wellenförmig verlaufenden Venen liegen in den oberflächlichen Schichten der Subkutis und verbinden sich überall mit den Kapillaren. Die Kapillaren bilden ein flaches Gefäßnetz unterhalb der Epidermis.

Berechnungen der Anzahl der Kapillaren im Verhältnis zu der Hautoberfläche ergeben, daß die Schleimsäcke mit Gefäßen schwächer versorgt sind als die eigentliche Haut.

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für vergleichende Anatomie an der Jagellonischen Universität ausgeführt. Dem Leiter des Instituts Herrn Prof. Dr. Z. Grodziński sprechen wir unseren herzlichsten Dank für die Erteilung des Themas, seine ständige Hilfsbereitschaft und außerdem für seine wertvollen Winke und Ratschläge bei der Ausführung der Zeichnungen aus.

### Literaturverzeichnis.

- 1) Cole F. J., A Monograph on the General Morphology of the Myxinoid Fishes Based on a Study of *Myxine*. On some Peculiarities of the Afferent and Efferent Branchial Arteries of *Myxine*. Trans. R. Soc. Edinburgh B. 48. 1912. — 2) Cole F. J., A Monograph on the General Mor-

phology of the Myxinoid Fishes Based on a Study of *Myxine*. P. VI. The Morphology of the vascular system. *ibidem* V. 54. 1925. — 3) Favaro G., Fische-*Cyclostomata*. Bronn H. G. — Klassen und Ordnungen des Tier-Reichs. Leipzig 1926. — 4) Grodziński Z., Über das Blutgefäßsystem von *Myxine glutinosa* L. Bull. Acad. Cracovie. 1926. — 5) Grodziński Z., Bemerkungen über das Lymphgefäßsystem der *Myxine glutinosa* L. *ibidem* 1932. — 6) Krogh A., Anatomie und Physiologie der Kapillaren. Berlin 1924. — 7) Müller J., Vergleichende Anatomie der Myxinoiden. III Abhand. Akad. Berlin 1841. — 8) Pietschmann Y., *Cyclostomata*. Kückenthal-Handbuch der Zoologie. Vol. 6. Part. II. 1933. — 9) Schaffer J., Zur Kenntnis der Hautdrüsen bei den Säugetieren und bei *Myxine*. Zeitsch. Anat. Entwickl. Bd. 76. 1925.

### Zeichenerklärung.

A — Epidermis	d — Umhüllung des Schleimsacks
a — Abzweigungen der <i>A. cutanea</i>	e — Spindelförmige Zellen
ac — <i>A. cutanea</i>	f — Fadenförmige Zellen
as — <i>A. segmentalis</i>	u — Öffnung des Schleimsacks
B — Kutis	v — Abzweigungen der <i>V. cutanea</i>
C — Subkutis	vs — <i>V. segmentalis</i>
— Kapillargefäße	

---



*Corpus lymphaticum subdermale u žab: Rana esculenta, R. temporaria i R. terrestris. — Corpus lymphaticum subdermale in the frogs: Rana esculenta, R. temporaria and R. terrestris.*

Mémoire

de M. H. SZARSKI,

présenté le 7 Mars 1938 par M. H. Hoyer m. t.

(Planche 2).

### Introduction

According to Gaupp, Fuchs, Weidenreich and others, frogs do not possess lymphatic nodes, often however accumulations of lymphocytes in them have been found, in the form of well defined regularly occurring bodies.

In tadpoles, accumulations of lymphocytes were found in several parts of the body, according to their location they were called: dorsal bodies of the gill cavity (Goffaux, Braunmühl), ventral bodies of the gill cavity (Goffaux, Braunmühl), inguinal organs (Graeper), (all paired) and unpaired perilaryngeal body (Goffaux, Braunmühl). All these organs disappear during the metamorphosis. In a newly metamorphosed frog following paired lymphoidal bodies were found: dorsal gill remnants (Maurer), medial gill remnants (Maurer), ventral gill remnants (Maurer) called by Norris *Glandulae pseudothyreoidae* and by Braunmühl *Corpora myelo-lymphatica parajugularia*, *Corpora procoracoidalia* (Gaupp) called by Fuchs and Hoch *Glandulae interpositae*, *Glandulae paracoccygeae* (Kopsch) and unpaired *Corpus propericardiale* (Gaupp). From these organs, the dorsal and ventral gill remnants were perceived only by

Maurer, their discoverer, who writes that they disappear in a short time after the metamorphosis. Remaining organs are present also in mature frogs in which Holl, Kingsbury, Jolly and Myers, described besides the above, the accumulations of lymphocytes in the mucosa of the nasal and mouth cavities. According to Jolly, more compact bodies are present in the subcutaneous spaces of the fore part of the body.

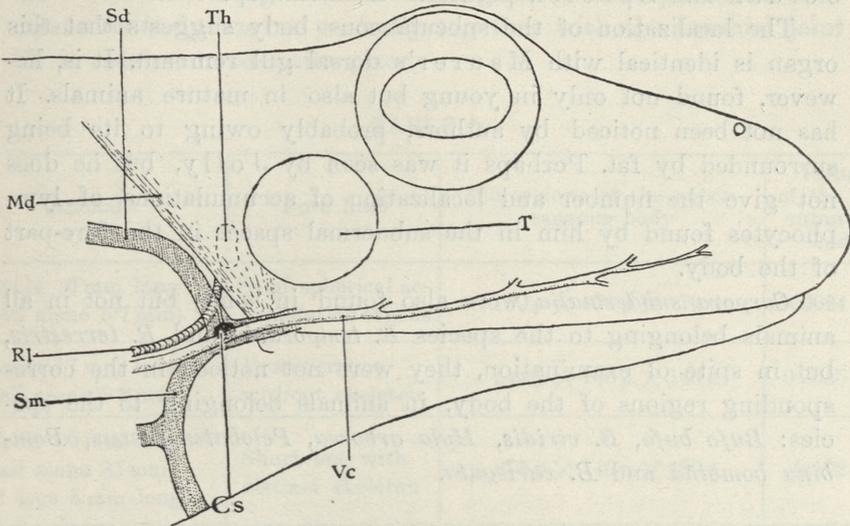
During the investigations of the blood vessels in the thymus of *Salientia*, an organ, which looked like above mentioned lymphoidal bodies, attracted my attention. While looking for details, I investigated mature animals belonging to the following species: *Rana esculenta*, *R. temporaria*, *R. terrestris*, *Bufo bufo*, *B. viridis*, *Hyla arborea*, *Pelobates fuscus*, *Bombina bombina* and *B. variegata*, as also tadpoles of *R. esculenta* in varied stages of development. The majority of the animals had the blood vessels injected with India ink or with prussian blue. The specimens were dissected under a binocular microscope, or series of slips were cut from animals embedded in paraffin or celloidin. The volume of the organs was measured by an indirect method, namely, the organ in all the sections was drawn with the aid of Abbé camera lucida, then the surfaces of the drawings were measured with a planimeter and the volume of each section was calculated, the total being the volume of the whole organ. All measurements were performed on preparations dehydrated and closed in Canada balsam or in cedar oil.

Where no name of investigator is mentioned after the anatomical name, the nomenclature of Gaupp has been used.

### **The morphology of the subcutaneous body in adult animals**

In adult animals belonging to species *R. esculenta*, an accumulation of fat is usually found directly under the skin, behind the mandibular joint, in the place where *Septum dorsale* of the subdermal lymph spaces joins *Septum submaxillare*. In animals whose blood vessels had been injected with stain, a region in the fat body is seen in which the blood vessel net is much more dense, than in the remaining places of the fat tissue. In preparations of this region, dehydrated and cleared in cedar oil or cut into a series of slips, is distinctly seen a well defined organ — the subcutaneous body — richly supplied with blood vessels.

Its shape is round or oval, the longer axis being 400—700  $\mu$  long, the shorter 300—500  $\mu$ , in the bodies of animals belonging to the species *Rana esculenta*. Some measurements performed on the subcutaneous bodies of the two other investigated species of *Rana* gave similar results.



Textfig. 1. Scheme showing the localization of the subcutaneous body in a mature frog (Outlines after Gaupp).

The subcutaneous body lies inside the *Septum submaxillare* near *Vena cutanea magna*, in the place where this septum is connected with *Septum dorsale*, perforated by *Ramus lateralis Arteriae cutaneae magnae* (Textfig. 1). The histology of the organ does not differ from other lymphoidal bodies of the frog, namely, in the net of the blood vessels mostly lymphocytes are visible.

The diameter of the artery of the subcutaneous body, which runs from *R. lateralis A. cutaneae magnae*, is usually about 25  $\mu$ , that of the vein, which opens into *V. cutanea magna*, about 50  $\mu$ . The meshes of the blood vessel net measure in diameter 32—90  $\mu$ , so they are approximately equal to the meshes in the thymus (SzarSKI). The diameter of the capillary blood vessels is very great, usually measures 16—35  $\mu$  and is therefore more than double the size of the capillaries in the thymus (fig. 2, pl. 2). Owing to that fact on the preparations injected and mounted in toto,

the whole organ appears as a tangle of blood vessels (fig. 1, pl. 2). The large diameters of capillary blood vessels in the other lymphatic organs of frogs were noticed by Braunmühl, Fuchs, Nakajima, Hoch and others. They are all of opinion that this condition induces a sluggish flow of blood that, according to Jordan and Speidel, promotes the hematopoiesis.

The localization of the subcutaneous body suggests that this organ is identical with Maurer's dorsal gill remnant. It is, however, found not only in young but also in mature animals. It has not been noticed by authors, probably owing to its being surrounded by fat. Perhaps it was seen by Jolly, but he does not give the number and localization of accumulations of lymphocytes found by him in the subdermal spaces in the fore-part of the body.

*Corpora subdermalia* were also found in some, but not in all animals belonging to the species *R. temporaria* and *R. terrestris*, but in spite of examination, they were not noticed in the corresponding regions of the body, in animals belonging to the species: *Bufo bufo*, *B. viridis*, *Hyla arborea*, *Pelobates fuscus*, *Bombina bombina* and *B. variegata*.

#### The development of the subcutaneous body in *R. esculenta*

The first rudiment of the subcutaneous body is visible in a tadpole 10 mm long (the tail alone 5.7 mm). In such a tadpole none of the bodies of the gill cavity (Goffaux, Braunmühl) are to be seen. The subcutaneous body is to be found in the posterior part of the gill cavity in the vicinity of the anlage of the fore limb which appears now as a semi-spherical protuberance composed of mesenchymatous cells. In front of the rudiment of the leg a slight thickening is situated on the membrane which divides the upper part of the gill cavity from *Sinus lymphaticus temporalis* (Kampmeier). This thickening is formed also by mesenchymatous cells and measures in the cranio-caudal direction 109  $\mu$  in others two 70  $\mu$  (fig. 6, pl. 2).

In a slightly older tadpole, 17 mm long (the tail alone 10 mm) the ventral bodies of the gill cavity are usually well developed, often the rudiments of the dorsal bodies are found too. In the fore limb no skeletal elements are visible. In such a tadpole the subdermal body is always distinctly seen. It is, as before, atta-

ched to the membrane which divides the gill cavity from the lymphatic sinus, it grows however deeply into *Sinus lymphaticus* (fig. 5, pl. 2).

In the later development, the growth of the fore limb induces little changes in the localization of the subcutaneous body which are drawn on Textfig. 2 and 3. During the metamorphosis the subcutaneous body moves ventrally together with the brachial joint till it reaches its definite place.

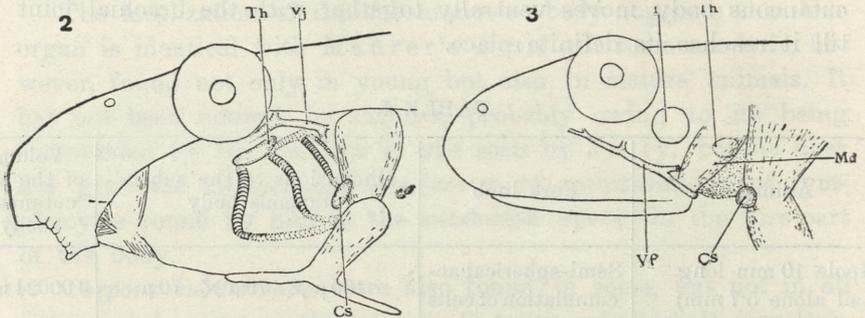
TABLE I.

Animal	Fore limb	Dimensions of the subcutaneous body	Volume of the subcutaneous body
Tadpole 10 mm long (tail alone 5.7 mm)	Semi-spherical accumulation of cells	100 $\mu$ $\times$ 70 $\mu$ $\times$ 70 $\mu$	0.00024 mm <sup>3</sup>
Tadpole 17 mm long (tail alone 9.8 mm)	Protuberance without skeleton	240 $\mu$ $\times$ 160 $\mu$ $\times$ 140 $\mu$	0.0035 mm <sup>3</sup>
Tadpole 60 mm long (tail alone 35 mm) hind legs 5 mm long	Short but with distinct skeleton	870 $\mu$ $\times$ 740 $\mu$ $\times$ 490 $\mu$	0.122 mm <sup>3</sup>
Tadpole 60 mm long (tail alone 35 mm) hind legs fully developed	Fully developed closed in gill cavity	1360 $\mu$ $\times$ 700 $\mu$ $\times$ 635 $\mu$	0.244 mm <sup>3</sup>
Young frog, directly after the metamorphosis	Fully developed	370 $\mu$ $\times$ 330 $\mu$ $\times$ 310 $\mu$	0.033 mm <sup>3</sup>
Mature frog	Fully developed	(400—700) $\mu$ $\times$ (320—500) $\mu$ $\times$ (300—400) $\mu$ *)	0.081 mm <sup>3</sup>

\*) Results of several measurements, other data being results of one measurement only.

The changes in the dimensions of *Corpus subdermale* are collected on table I. During the development of the tadpole the subcutaneous body grows very quickly, and reaches its greatest dimensions just before the metamorphosis. The metamorphosis causes a diminution in the organ as also in the whole body of the animal. After the metamorphosis there is a small increase of dimensions in the subdermal body but much less than in the whole body of the animal. The subcutaneous body is much larger in

comparison to the organs described by Goffaux and Braunnühl. If we take as an example a full grown tadpole with short posterior limbs (5 mm) the volume of the dorsal body of the gill cavity is  $0.00246 \text{ mm}^3$ , of ventral body  $0.00885 \text{ mm}^3$ , the volume of the subcutaneous body is  $0.122 \text{ mm}^3$ , and that of the thymus  $0.261 \text{ mm}^3$ .



Textfig. 2. and 3. Schemes showing the localization of thymus and of the subcutaneous body, just before and directly after the metamorphosis.

The shape of the subcutaneous body does not alter much during the development. The first rudiment is longer in the cranio-caudal direction, afterwards the body assumes a more round shape, and in a full grown tadpole its form is often affected by the vicinity of the fore limb which induces a concavity in the surface of the organ. After the metamorphosis the subcutaneous body becomes round or oval.

As before mentioned, the first rudiment of the subdermal body is composed of mesenchymatous cells. But already in a tadpole 17 mm long the lymphocytes prevail, and in a 60 mm long the appearance of the subcutaneous body does not differ from that of the mature animal.

The capillary blood vessels are present in the first rudiment of the subdermal body, as it develops around the blood vessels running in the membrane dividing the gill cavity from *Sinus lymphaticus temporalis*. The connection of these blood vessels with larger trunks are not distinctly visible. Probably the blood of this region flows into the venous sinuses of the pronephros which are situated in the immediate neighbourhood.

In a 17 mm long tadpole a distinct vein is present, conveying the blood from the subdermal body to the venous sinus of prone-

phros. Several small arteries run to the subcutaneous body from *Arteria cutanea magna* situated immediately behind the organ. Further changes in the blood vessels of the *Corpus subdermale* affect only the vein. While the pronephros atrofies, the vein of the subdermal body opens directly to *Ductus Cuvieri*. After the metamorphosis *Vena cutanea magna* is developed in the immediate vicinity of the organ and a new vessel appears, connecting the blood vessels of the organ with this newly formed vein. At the same time the former vein which was running to *Ductus Cuvieri* atrofies.

The dimensions of the meshes of the blood vessel net change only slightly in the course of development. At first they measure 30–40  $\mu$  and they attain 30–80  $\mu$  after the metamorphosis. The capillary blood vessels at the same time increase in diameter from 7  $\mu$  to 10–30  $\mu$ .

### Summary

Under the skin of the frog, just behind the mandibular joint is situated an organ, *Corpus lymphaticum subdermale*, in the place where *Septum dorsale* of the subcutaneous lymphatic spaces is connected with *Septum submaxillare*.

The histological structure of the subcutaneous body is similar to that of the other lymphoidal organs of the frog. It has the appearance of a mass of lymphocytes perforated by blood capillaries.

The artery runs to the subcutaneous body from *Ramus lateralis Arteriae cutaneae magnae*, the vein of the organ opens into *Vena cutanea magna*. The blood vessels in the body are very spacious.

This organ has probably been described by Maurer in the young animals as the dorsal gill remnant.

It is first seen in a 10 mm long tadpole as an accumulation of mesenchymatous cells on the membrane, which divides the gill cavity from *Sinus lymphaticus temporalis*. It attains its maximal dimensions just before the metamorphosis. The capillary vessels narrow at first, widen considerably during the development and before the metamorphosis reach the dimensions found in a mature animal.

The present work has been performed under the kind guidance of Prof. Dr Z. Grodziński to whom I beg to offer my grateful acknowledgements for his valuable advice and criticism.

Institute of Comparative Anatomy of the Jagellonian University Kraków.

### Description of figures in plate 2

All figures have been taken from animals belonging to the species *R. esculenta*.

1. Photograph of the subcutaneous body of a mature frog, blood vessels being injected with prussian blue. Preparation closed in toto in Canada balsam.
2. Photograph of the subcutaneous body of a mature frog, highly magnified. The diameters of capillary blood vessels are visible.
3. Photograph of the subcutaneous body of a mature frog, slightly magnified.
4. Cross section through the body of a tadpole 60 mm long (Posterior limbs 5 mm).
5. Cross section through the body of a tadpole 17 mm long.
6. Cross section through the body of a tadpole 10 mm long.

#### Abbreviations:

Cs = *Corpus lymphaticum subdermale*.

Md = *Musculus depressor mandibulae*.

Rl = *Ramus lateralis A. cutaneae magnae*.

Sd = *Septum dorsale*.

Sm = *Septum submaxillare*.

T = *Tympanum*.

Th = *Thymus*.

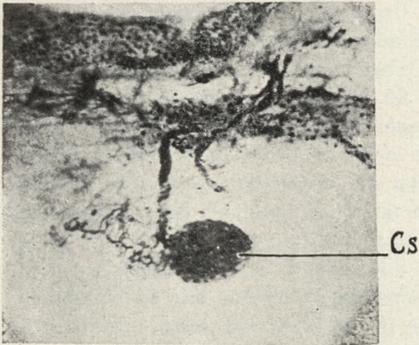
Vc = *Vena cutanea magna*.

Vf = *Vena facialis*.

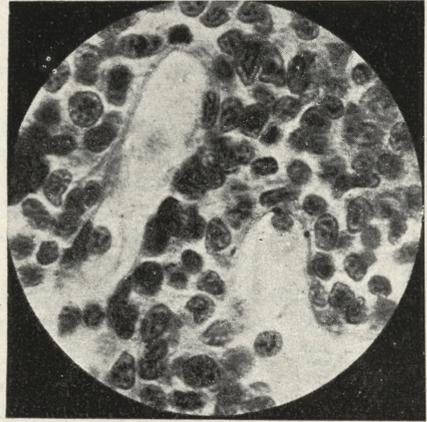
Vj = *Vena jugularis interior*.

### Bibliography

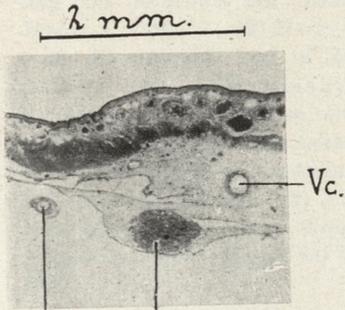
- 1) Braunmühl A. v., Über einige myelo-lymphoide und lympho-epiteliale Organe der Anuren. Ztschr. mikr.-anat. Forsch. 4. 1926. — 2) Dustin A. P., A propos d'une note récente de M. Jolly sur les organes lymphoïdes céphaliques des Batraciens. C. R. Soc. Biol. 82. 1919. — 3) Fuchs H., Von der *Glandula interposita* s. *Glandula inclusa* des Frosches (Ein neues Organ). Anat. Anz. 61. 1926. — 4) Fuchs H., Von dem Vorkommen der *Glandula interposita* bei den einheimischen Batrachiern (*Amphibia anura*). Anat. Anz. 62. 1926/27. — 5) Gaupp E., Anatomie des Frosches. Abt. 3. Braunschweig 1904. — 6) Goffaux R., Les formations amygdaliennes chez les têtards d'amphibiens anoures. C. R. Soc. Biol. 82. 1919. — 7) Graeper L., Demonstration mikroskopischer Präparate vom einem bisher nicht beschriebenen Inguinalorgan der Kaulquappen von *Rana fusca* und *esculenta*. Verh.



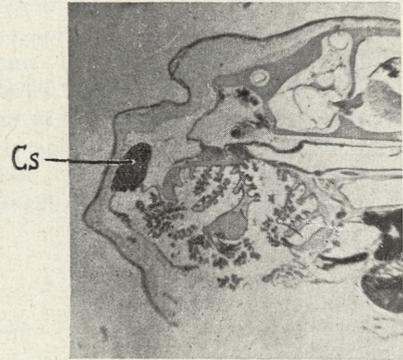
2 mm. 1



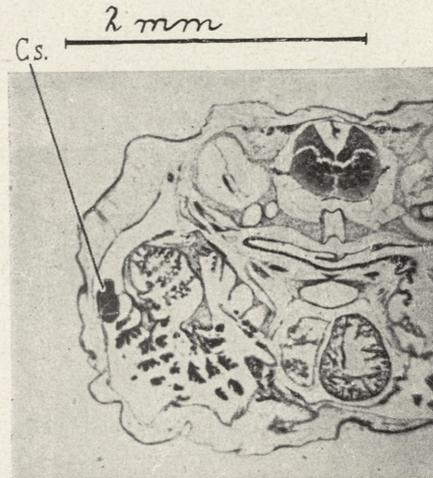
0.05 mm. 2



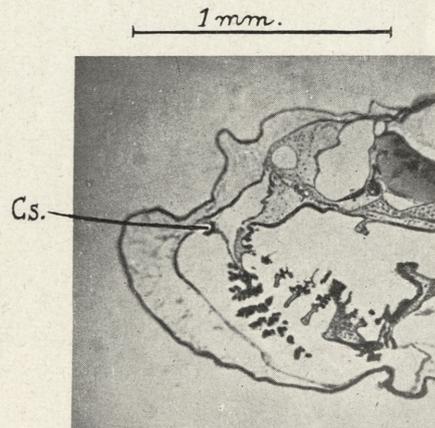
2 mm. 3



3 mm 4



2 mm 5



1 mm. 6

H. Szarski phot.



- Anat. Ges. Anat. Anz. 57. Ergänzsh. 1923. — 8) Hoch P., Über die Histologie der *Glandula interposita* des Frosches. Ztschr. mikr.-anat. Forsch. 24. 1931. — 9) Holl M., Zur Anatomie der Mundhöhle von *Rana temporaria*. Sitzungsber. Wien. Akad. Abt. 3. 92. 1885. — 10) Jolly J., Sur les organes lymphoïdes céphaliques des Batraciens. C. R. Soc. Biol. 82. 1919. — 11) Jolly J., Sur l'existence chez les Batraciens, d'organes lymphoïdes pouvant être considérés comme des ébauches des ganglions lymphatiques. C. R. Soc. Biol. 82. 1919. — 12) Jordan H. E. and Speidel C. C., Studies on lymphocytes. IV. Further observations upon the hemopoietic effects of splenectomy in frogs. Journ. Morph. Physiol. 40. 1925. — 13) Kampmeier O., The development of the anterior lymphatics and lymph hearts in anuran embryos. Am. Journ. Anat. 30. 1922. — 14) Kingsbury B. F., Amphibian tonsils. Anat. Anz. 42. 1912. — 15) Kopsch Fr., Ein bisher unbekanntes Organ, *Glandula paracoccygea* des Frosches. Anat. Anz. 54. 1921. — 16) Maurer F., Schilddrüse, Thymus und Kiemenreste der Amphibien. Morphol. Jahrb. 13. 1888. — 17) Myers M. A., A study of the tonsillar development in the lingual region of anurans. Journ. Morph. 45. 1928. — 18) Nakajima A., Beitrag zur Kenntnis der *Glandula paracoccygea* des Frosches. Fol. Anat. Japon. 4. 1926. — 19) Norris H. W., The origin of the so-called »Ventraler Kiemenrest« and of the *Corpus propericardiale* of the frog. Anat. Anz. 21. 1902. — 20) Pischinger A., Kiemenanlagen und ihre Schicksale bei Amnioten. Schilddrüse und epiteliäle Organe der Pharynxwand bei Tetrapoden. Handb. Vergl. Anat. Wirbelt. III. Berlin 1937. — 21) Szarski H., The blood vessels of the thymus gland in some of the *Salientia*. Bull. Acad. Pol. Cracovie 1937. — 22) Toldt C., Über lymphoide Organe bei Amphibien. Sitzungsber. Acad. Wien. Abt. 2. 58. 1868. — 23) Weidenreich F., Allgemeine Morphologie des Gefäßsystems. Handb. Vergl. Anat. Wirbelt. VI. Berlin 1933.
-



*Zależność przyzwyczajania się wirczyków (Vorticella) od częstości powtarzających się bodźców. — Über die Abhängigkeit der Gewöhnung bei Vorticellen von der Frequenz wiederholter Reize.*

Mémoire

de M<sup>lle</sup> **R. SKROCHOWSKA**,

présenté le 7 mars 1938 par M. H. Hoyer m. t.

**Zur Fragestellung.**

Die Frage, welcher dieser Beitrag gewidmet ist, bildete schon öfters den Gegenstand von Untersuchungen über das Gedächtnis bei den Einzelligen, vor allem bei freischwimmenden Protozoen. Schon Day und Bentley (1911) haben Versuche über die Lernfähigkeit bei der Gattung *Paramaecium* (Ehrbg.) unternommen. Insbesondere haben sie Umkehrreaktionen der Paramaecien in einer Kapillarröhre beobachtet. Es hat sich herausgestellt, daß die Zeitabstände zwischen den Umdrehungen eines Individuums im Sinne der Längsachse mit der wachsenden Zahl der Versuche und der ausgeführten Umkehrreaktionen abnehmen. In letzter Zeit sind einige weitere Arbeiten über das nämliche Thema erschienen. F. Bra m s t e d t ('35) hat *Paramaecium caudatum* (Ehrbg.) und *Stylonychia mytilus* (Müll.) untersucht und ist zu nachstehenden Folgerungen gekommen:

1. die Tierchen sind imstande zwei Reize, von denen der eine unbedingt, der andere bedingt ist, (hell — warm, dunkel — kalt) zu assoziieren;

2. Paramaecien erfassen gedächtnismäßig nicht nur die Gestalt, sondern auch die Größe des Raumes, in welchem sie sich durch einige Zeit aufhielten und bewegten. Stylonychien assoziieren ebenfalls zwei verschiedene miteinander verbundene Reize.

Auch die Versuche Soest's ('37) über die Gattungen *Paramaecium*, *Stentor* (Ehrbg.) und *Stylonychia* bestätigen das Vorkommen von Gedächtniserscheinungen bei Protozoen. Überdies sagt Soest ausdrücklich, bei *Stylonychia* individuelle Unterschiede im Reagieren auf die Rauheit der Unterlage bemerkt zu haben.

Am Beginn meiner Studien über Gedächtniserscheinungen bei Ciliaten hatte ich vor allem Erscheinungen der Reizassoziation bei festsitzenden Formen im Auge. Ich sollte mich überzeugen, ob die Infusorien aus der Familie der Vorticelliden zwei gleichzeitig einwirkende Reize tatsächlich assoziieren. Da sie auf eine Erschütterung mit einer Kontraktion reagieren, auf eine plötzliche Verdunkelung hingegen keine sichtbare Antwort geben, beschloß ich die beiden Reize, Erschütterung und Belichtungswechsel, gleichzeitig anzuwenden. Anfangs erschütterte ich den Objektträger mit den Tieren durch eine Zeit lang und verdunkelte zugleich auf einen Moment das Gesichtsfeld. Würden sich die Vorticellen nach einer gewissen Zahl solcher Versuche auf bloße Verdunkelung hin, ohne mechanischen Reiz, kontrahieren, dann wäre ein Beweis erbracht, daß sie die früher erfahrenen Erschütterungen und die gleichzeitig eintretenden Verdunkelungen assoziiert haben.

Die Versuche führte ich derartig aus, daß ich die Infusorien im dunkeln hielt und im Momente der Erschütterung greller Belichtung aussetzte. Es blieb jedoch die erwartete Reaktion aus, da nach einigen zwanzig Reizaffektionen, die Tiere sich an die Erschütterungen gewöhnten und nicht mehr reagierten. Somit war der Weg zu weiteren Versuchen in dieser Richtung verschlossen. Da war es angezeigt zu untersuchen, wovon die besagte Gewöhnung abhängt. Man muß hierbei den Begriffsunterschied zwischen dem »Gedächtnis« und der »Gewöhnung« klar ins Auge fassen. Jenes ist — nach Garbowski — die primäre Fähigkeit lebender Wesen erhaltene Eindrücke (auf eine noch nicht genügend erforschte Weise) festzuhalten; diese ist eine sekundäre, durch das Gedächtnis bedingte Folgeerscheinung des Verhaltens. Das Gedächtnis im besagten Sinn ist nicht nur den Nervenzellen, sondern auch einem jeden Teilchen lebender Zellsubstanz eigen; diese Fähigkeit scheint übrigens selbst auf unorganische Stoffe überzugreifen, die unter Einfluß wiederholter physikalischer Prozesse neue Eigenschaften zeigen, ohne

sich chemisch verändert zu haben, wie dies z. B. Wilh. Ostwald für Schwefel mit Nachdruck hervorhebt. Es haben übrigens schon mehrere Autoren ihre Aufmerksamkeit darauf gerichtet.

Was die Gewöhnung anbelangt, hat Jennings ('10) für *Stentor*, *Epistylis* und *Carchesium* festgestellt, daß sie nach gewisser Zeit auf nicht besonders heftige, sich wiederholende Reize zu reagieren aufhören. Dembowski ('34) hat die Beobachtung gemacht, daß Vorticellen, die sich in der Nähe von *Tubifex*, des bekannten Ringelwurmes befinden, der durch regelmäßige Kontorsionen des Körpers das Wasser anhaltend erschüttert, sich anfangs bei jeder erfolgenden Erschütterung kontrahieren, nach einiger Zeit jedoch diese Reaktionsart einstellen. Danisch ('21) hat Versuche mit *Vorticella nebulifera* durchgeführt. Er hat sowohl chemische, wie mechanische Reize angewendet und das Verhalten der Vorticellen unter verschiedenen Verhältnissen beschrieben; auch hat er die Reizschwelle bestimmt, wann sie noch durch Kontraktionen reagiert. Die Stufe der Reizbarkeit hängt nach ihm von der Stärke des Reizes ab.

Es ist recht auffallend, daß bis jetzt niemand die Erscheinung der Gewöhnung der Protozoen an wiederholte ähnliche Reize näher verfolgt hat. Bei höheren Tieren hängen die Art und der Grad der Reaktion auf einen gegebenen Reiz bekanntlich davon ab, an was sich das Tier vorher gewöhnt hatte. Bezeichnend ist folgendes Beispiel: wenn wir Daphnien durch eine gewisse Zeit in der Finsternis halten, so zeigen sie negative Phototaxis. Umgekehrt, wenn sie sich vorher in einem hellen Behälter befanden, wird man bei ihnen positive Phototaxis feststellen. Es tritt hier die Bedeutung der Gewöhnung für den Reaktionsverlauf bei demselben Tier klar zutage. Dies kann so weit gehen, daß es die betreffende Fähigkeit der Tiere in eine entgegen gesetzte umstellen kann.

Schon im Laufe meiner Versuche erschien eine Arbeit von St. Wawrzyńczyk ('37) über *Spirostomum ambiguum* (Ehrbg.) mit ähnlicher Aufgabestellung, wie die meinige. Der Autor schildert das Verhalten von *Spirostomum* gegen Erschütterungen, wobei er Erschütterungen von wechselnder Häufigkeit in Anwendung brachte. Er kam zu folgenden Resultaten: 1. die Zeit des Auftretens der Kontraktionen und ihres Schwundes hängt ab von der Häufigkeit des mechanischen Reizes (Hammerschläge);

2. der Verlauf der Dauer und der Einstellung der Kontraktionen hat einen periodischen Charakter. Er ist rythmisch, so daß die betreffende Kurve eine zackig gebrochene Linie bildet, wo nach Perioden schwächerer Kontraktionen solche von gleichmäßiger oder gar erhöhter Intensität folgen. Dieser Verlauf entspricht im allgemeinen den Erscheinungen, die für den Verlauf des Lernens und Vergessens bei höheren Tieren und selbst beim Menschen charakteristisch sind. 3. Das mittels Schlägen gereizte *Spirostomum* behält diesen Rythmus gedächtnismäßig, so daß es sich auch bei Entfall eines effektiven Reizes kontrahiert. 4. Das bis zur gänzlichen Einstellung der Kontraktionen gereizte *Spirostomum* wird auf die Dauer von 47 Minuten gegen Reize unempfindlich.

Beim Überblick der bisher in Angriff genommenen Probleme aus dem Gebiete der Ethologie und Psychologie der Infusorien vermißt man nun die Berücksichtigung eines Momentes, welches die eigentliche Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen ausmachte. Verschiedene Autoren haben Infusorien dressiert, wobei sie sich mannigfacher Reize bedienten, wie elektrischer, mechanischer u. dgl. ohne zu beachten, daß wir auch bei Protozoen mit einer Gewöhnung an empfangene Reize rechnen müssen. Ich war somit bestrebt eben diese Lücke auszufüllen. Als Versuchsmaterial boten hier die festsitzenden Infusorien ein besonderes Interesse, insofern vorher meistens freischwimmende Formen bearbeitet worden waren.

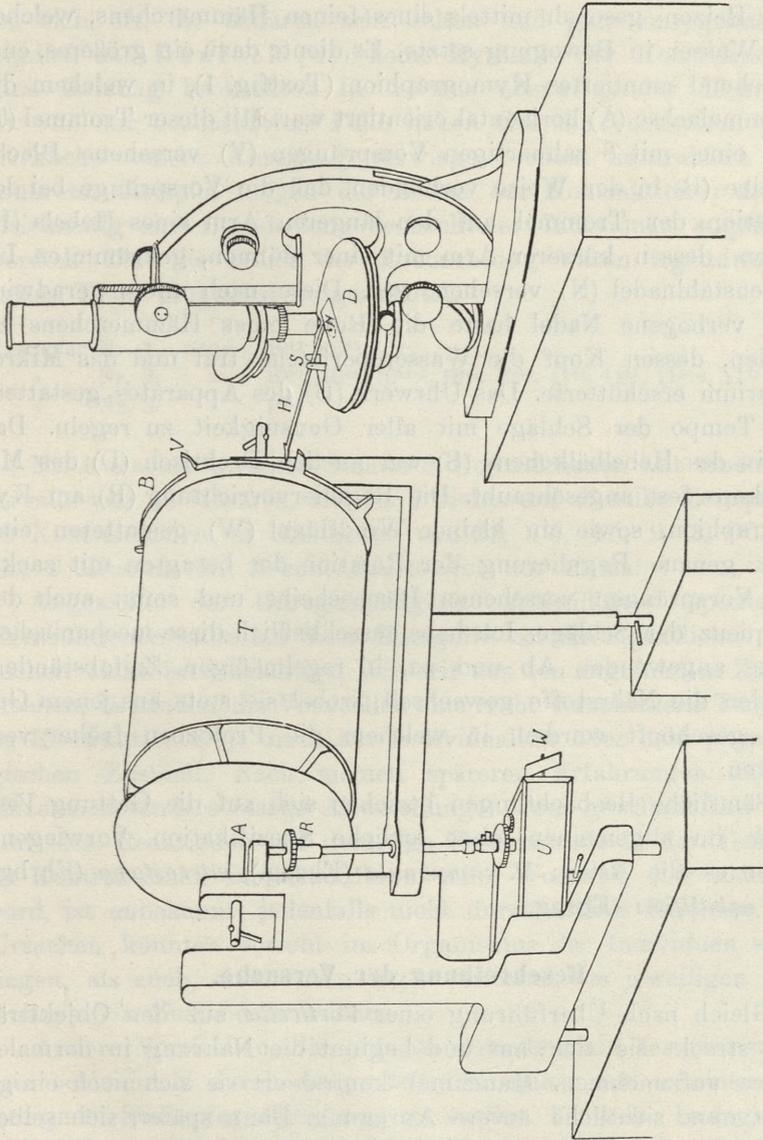
An diesem Material sollte nun eine Antwort auf folgende Fragen gefunden werden:

1. ob die Vorticellen sich an rythmisch wiederholte, mechanische Reize gewöhnen;
2. ob und inwiefern die Fähigkeit der Gewöhnung von der Frequenz der Reizung abhängt;
3. ob und wo eine Grenze der Reizfrequenz besteht, über die hinaus eine Gewöhnung nicht mehr stattfindet;
4. welche Reizfrequenz für die Gewöhnung der Vorticellen die geeignetste ist (Frequenzoptimum)?

#### Die Methodik.

Die zu den Versuchen verwendeten Vorticellen stammten aus einer natürlichen Zucht in Behältern, die mit kleinen Fischen (wie *Gasterosteus*) oder Schnecken besetzt waren. Sie waren an

Wasserpflanzen, an allerlei organischen Überresten oder an den genannten Tieren selbst angeheftet in Menge zu finden. Oft habe



Textfig. 1.

ich Exemplare beobachtet, die sich am Objektträger angeheftet haben. Bei allen in gewöhnlicher Zimmertemperatur durchgeführt-

ten Versuchen wurden die Infusorien mit einer Pipette auf den Objektträger mit eingeschliffener Vertiefung übergeführt und verweilten während der Versuche in derartigen Mikroaquarien. Das Reizen geschah mittels eines feinen Hämmerchens, welches das Wasser in Bewegung setzte. Es diente dazu ein größeres, entsprechend montiertes Kymographion (Textfig. 1), in welchem die Trommelachse (A) horizontal orientiert war. Mit dieser Trommel (T) war eine, mit 8 zahnartigen Vorsprüngen (V) versehene Blechscheibe (B) in der Weise verbunden, daß die Vorsprünge bei der Rotation der Trommel auf den längeren Arm eines Hebels (H) trafen, dessen kürzerer Arm mit einer dünnen, gekrümmten Insektenstahlnadel (N) versehen war. Diese nach unten geradwinklig verbogene Nadel hatte die Rolle eines Hämmerchens zu spielen, dessen Kopf die Wasseroberfläche traf und das Mikroaquarium erschütterte. Das Uhrwerk (U) des Apparates gestattete das Tempo der Schläge mit aller Genauigkeit zu regeln. Das Stativ des Hebelbälkchens (S) war an den Drehtisch (D) des Mikroskops fest angeschraubt. Die Reguliervorrichtung (R) am Kymographion, sowie ein kleiner Windflügel (W) gestatteten eine ganz genaue Regulierung der Rotation der besagten mit zackigen Vorsprüngen versehenen Blechscheibe und somit auch der Frequenz der Schläge. Ich habe ausschließlich diese mechanischen Reize angewendet. Ab und zu, in regelmäßigen Zeitabständen, wurden die Nährstoffe gewechselt, wobei sie stets aus jenem Gefäße geschöpft wurden, in welchem die Protozoen früher verweilten.

Sämtliche Beobachtungen beziehen sich auf die Gattung *Vorticella* im allgemeinen, ohne artliche Spezifikation. Vorwiegend waren es die Arten: *V. campanula* (Ehrbg.), *microstoma* (Ehrbg.) und *nebulifera* (Ehrbg.).

### Beschreibung der Versuche.

Gleich nach Überführung einer *Vorticella* auf den Objektträger, streckt sie sich aus und beginnt die Nahrung in normaler Weise aufzunehmen. Manchmal kontrahiert sie sich noch einige Male, ohne sichtliche äußere Anregung. Dann später, sich selber in vollständiger Ruhe überlassen, kontrahieren sich die Tierchen nach Jennings (10) von Zeit zu Zeit in regelmäßigem Rythmus; J. gibt aber nicht an, wie oft dies geschieht, doch dürfte dies

mit den physiologischen Prozessen und Zuständen des Tieres zusammenhängen. Ich habe in dieser Hinsicht kein einheitliches Verhalten bei Vorticellen feststellen können; die einen kontrahieren sich oft, die anderen sehr selten und ganz unregelmäßig. Ähnlich hat Danisch (21) keine Rythmik der Kontraktionen ohne Reizung beobachtet. In weitaus überwiegender Mehrzahl der von mir beobachteten Fälle haben sich die Vorticellen ohne merkliche äußere Anregung vorwiegend nicht kontrahiert. Als konkretes Beispiel mögen die Zeiten der Kontraktionen dreier, gleichzeitig eine Stunde lang beobachteter Individuen angeführt werden. Für die Dauer der Beobachtung waren irgendwelche äußere Reize möglichst ausgeschaltet.

Exemplar Nr. 1. Stude: 10<sup>12</sup>, 10<sup>58</sup>  
 » Nr. 2. » 10<sup>19</sup>, 10<sup>40</sup>, 10<sup>41.5</sup>, 10<sup>46</sup>, 10<sup>55</sup>, 11<sup>04</sup>, 11<sup>05</sup>, 11<sup>05.5</sup>, 11<sup>12</sup>, 11<sup>14</sup>  
 » Nr. 3. » 10<sup>44</sup>

Nr. 1 machte in einer Stunde 2 Kontraktionen mit einem Intervalle von 46 Minuten. Bei Nr. 2 fielen auf dieselbe Zeitspanne 10 Kontraktionen in Abständen von 21, 1.5, 4.5, 9, 1, 0.5, 6.5 und 2 Minuten. Nr. 3 kontrahierte sich nur einmal.

Angesichts der Unregelmäßigkeit »freiwilliger« (spontaner) Kontraktionen habe ich diese Kategorie bei den eigentlichen Versuchen nicht berücksichtigt. Wie wir aus den angeführten Zahlen ersehen, bekunden die Vorticellen eine recht verschiedene Tendenz zu Kontraktionen je nach der Individualität oder dem physiologischen Zustand. Nach meinen späteren Erfahrungen dürften einzelne besonders starke Abweichungen vom gewöhnlichen Verlauf der Reaktionen auf derartige Unterschiede in der Tendenz zu Kontraktionen zurückzuführen sein. Wodurch dies veranlaßt wird, ist unbekannt; jedenfalls nicht durch äußere Einflüsse. Die Ursachen könnten sowohl im Organismus der Individuen selbst liegen, als auch, wie Jennings vermutet, im jeweiligen physiologischen Zustand derselben.

Andere Vorticellen, die sich am Grunde nicht festgesetzt haben, schwimmen durch einige Zeit frei umher und scheinen eine geeignete Stelle zur Anheftung zu suchen. *Vorticella* bewegt sich nach vorwärts durch spirale Umdrehungen, wobei das Peristom einen weiteren Kreis beschreibt als der hintere Teil des Zellkörpers. Zum Richtungswechsel werden die Wimpern der ado-

ralen Zone benützt, indem sie im umgekehrten Sinne zu schlagen beginnen. Es kommt auch vor, daß eine *Vorticella* in gerader Richtung schwimmt, ohne spirale Kreise zu beschreiben. Zum Steuern dient der Stiel, welcher entsprechend gebogen und gerichtet wird. Danisch ('21) beobachtete Richtungsänderungen der Wimperbewegung, wenn anstatt der Nahrung Teilchen der chemischen Substanz, die bei den Versuchen als Reizmittel dient, in das Peristom hineingeraten. Jennings hat ein analoges Verhalten bei *Stentor* beobachtet.

Unter dem Einfluß von Erschütterungen kontrahieren sich manchmal auch freischwimmende Individuen, häufiger aber schwimmen sie in entgegengesetzter Richtung davon. Diese Erscheinung findet noch deutlicher bei freischwimmenden Individuen von *Epistylis* statt. Bei freiem Herumschwimmen von gewöhnlich sessilen Ciliatenformen ist eine Assimilation an freilebende zu bemerken. Eine freischwimmende *Vorticella* reagiert auf eine Erschütterung gewöhnlich durch Ortswechsel und nicht durch Kontraktion, was sie sicher tun würde, wenn sie im Momente der Reizeinwirkung angeheftet wäre.

Zu meinen Versuchen dienten Vorticellen, die auf einer Unterlage festgesetzt waren. Die Art der Reaktion wird bei *Vorticella* durch die Länge des Stieles beeinflusst. Kurzbestielte Exemplare sind auf Erschütterungen weniger empfindlich als die langbestielten. Andererseits aber vermögen die langgestielten sich dem Reize zu entziehen, indem sie sich so weit, wie dies die Länge des Stieles gestattet, abwenden. Hier taucht die interessante Frage auf, ob die festsitzenden Infusorien die Richtung des Reizes unterscheiden? Meine Versuche erlauben dieselbe positiv zu beantworten. Wie dies auch Danisch an Hand spezieller Versuche mit *Vorticella nebulifera* feststellen konnte, unterscheiden diese Tiere nicht nur die Richtung des Stromes, sondern reagieren auch darauf in spezifischer Weise. Eine *Vorticella* richtet nämlich ihren Körperkelch mit dem Peristom gegen die Wasserströmung. Dies steht im Zusammenhang mit der Richtung der durch den Wimperschlag erzeugten Strömung, das Tier nimmt eine derartige Stellung an, daß diese Strömung mit der Richtung der äußeren Wasserströmung übereinstimmt. Hierin liegt der Unterschied zwischen sesshaften und freischwimmenden Ciliaten, bei denen bis jetzt die Reaktionen des Probierens und Irrtums, nicht

aber die Richtungsreaktionen beschrieben worden sind. Ihr Verhalten erklärt sich durch die morphologischen Eigenschaften dieser Formen. Sie müssen die Richtung der Strömung unterscheiden und sich gegen dieselbe so stellen, daß ihnen die Wasserströmung Bakterien als Nahrung zuführe. Eine analoge Körperhaltung gegen die Strömung finden wir auch bei vielen höheren festzitzenden Wasserbewohnern, besonders deutlich bei Seetieren. So gibt Lo Bianco ('09) an, daß bei Hydroidpolypen des Golfes von Neapel, wie *Corydendrium*, *Eudendrium*, *Gemmaria* und *Tabularia* die Hydranten sich gegen die Wasserströmung richten, um die angeschwemmte Nahrung zu fangen.

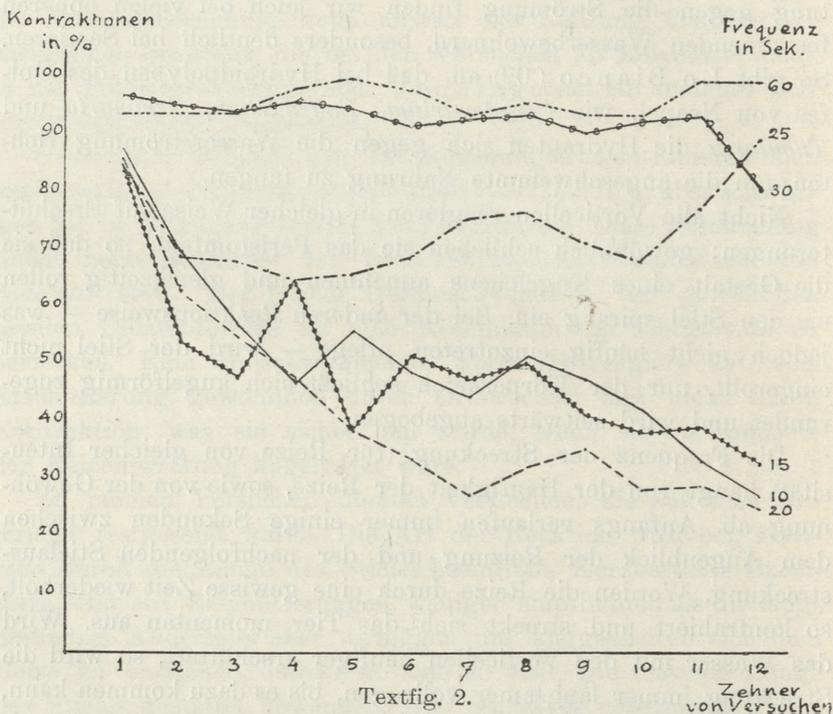
Nicht alle Vorticellen reagieren in gleicher Weise auf Erschütterungen; gewöhnlich schließen sie das Peristomfeld, so daß sie die Gestalt eines Kügelchens annehmen und gleichzeitig rollen sie den Stiel spiralig ein. Bei der anderen Reaktionsweise — was jedoch nicht häufig einzutreten pflegt — wird der Stiel nicht eingerollt, nur der Körperkelch schließt sich kugelförmig zugerundet und wird seitwärts abgebogen.

Die Frequenz der Streckung (für Reize von gleicher Intensität) hängt von der Häufigkeit der Reize, sowie von der Gewöhnung ab. Anfangs verlaufen immer einige Sekunden zwischen dem Augenblick der Reizung und der nachfolgenden Stielausstreckung. Werden die Reize durch eine gewisse Zeit wiederholt, so kontrahiert und streckt sich das Tier momentan aus. Wird das Wasser mit den Vorticellen häufiger erschüttert, so wird die Streckung immer langsamer vollzogen, bis es dazu kommen kann, daß das Tier, wenn die Reize zu häufig nacheinander folgen, sich für einige Zeit schließt und regungslos bleibt, oder aber nicht auf jeden einzelnen Reiz reagiert.

Wird der Rythmus der Erschütterungen geändert, sei es beschleunigt oder verlangsamt, so beginnen die Vorticellen, die bereits die Reaktionen eingestellt haben, sich wieder zu kontrahieren, jedoch in schwächerem Grade, und gewöhnen sich in kürzerer Frist an den neuen Rythmus.

Die Versuche verliefen in folgender Weise. Die Versuchsexemplare wurden in streng eingehaltenen Zeitabständen durch Erschütterungen gereizt. Die Reizfrequenz betrug 10, 15, 20, 25, 30 bis 60 Sek. Für jeden dieser Rythmen wurde das Verhalten von je 10 Exemplaren untersucht, jedes von ihnen wurde 120

mal gereizt, — die Gesamtzeit der Reizungsdauer war somit für jeden Rythmus verschieden. Nach einiger Zeit stellen die Vorticellen die Reaktionen ein, obschon die Reize fort dauern. Dies war der Fall, wenn der Nadelkopf am Kymographion das Wasser je 10, 15 oder 20 Sek. erschütterte.



Die Einstellung der Kontraktionen war eine sukzessive, wie es aus den Diagrammen zu ersehen ist, erfolgte jedoch nicht gleichmäßig. Aus den Tabellen I, II, III ergibt sich die Tatsache der Gewöhnung dieser Ciliaten mit genügender Deutlichkeit trotz allen ziemlich bedeutenden Schwankungen im Gebaren einzelner Individuen. Die Tabellen registrieren die Zahl der Kontraktionen für je 10 Versuche mit ein und demselben Exemplare<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> In den Tabellen bedeuten die römischen Ziffern die sukzessiven Gruppen von je 10 Erschütterungen, die arabischen Ziffern — die Anzahl der Kontraktionen des gegebenen Exemplars im Verlauf von je 10 Erschütterungsversuchen; die Buchstaben bezeichnen die einzelnen Exemplare (Vorticellen), die zu den Versuchen verwendet wurden.

TABELLE I.  
Erschütterungen nach je 10 Sek.

Exemplar	Ordnungszahlen für je 10 Erschütterungen											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
a	7	7	5	4	5	8	2	5	5	6	0	0
b	7	6	4	5	5	3	1	5	2	3	3	2
c	10	3	2	1	0	2	3	7	2	1	1	2
d	9	8	8	4	5	6	4	4	5	5	3	1
e	9	10	6	6	8	4	6	7	8	6	3	2
f	6	1	7	5	6	2	3	4	2	1	1	2
g	10	10	3	9	9	5	10	5	4	4	6	2
h	10	9	6	5	7	7	7	7	4	7	7	4
i	10	9	8	6	9	9	7	7	8	6	5	8
j	10	7	8	6	2	3	2	1	8	4	5	5
Mittelwert	8·8	7	5·7	4·7	5·6	4·9	4·5	5·2	4·8	4·3	3·4	2·8

TABELLE II.  
Erschütterungen nach je 15 Sek.

Exemplar	Ordnungszahlen für je 10 Erschütterungen											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
a	5	9	9	7	7	9	7	9	9	6	3	3
b	10	9	10	10	9	10	5	9	7	6	8	6
c	8	2	2	6	2	1	5	8	0	0	1	0
d	10	1	1	5	3	1	2	4	2	2	0	2
e	9	9	2	5	1	3	5	7	6	8	2	3
f	10	8	7	9	5	6	4	3	5	4	4	4
g	8	2	3	5	1	3	3	4	2	4	5	3
h	8	9	10	10	6	5	10	9	8	6	9	4
i	10	1	0	4	3	7	4	2	2	3	4	6
j	7	4	4	4	2	7	3	3	1	0	4	3
Mittelwert	8·5	5·4	4·8	6·5	3·9	5·2	4·8	5·1	4·2	3·9	4·0	3·4

TABELLE III.  
Erschütterungen nach je 20 Sek.

Exemplar	Ordnungszahlen für je 10 Erschütterungen											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
a	8	5	3	1	1	3	1	1	2	3	0	4
b	10	6	3	5	4	2	2	3	6	2	5	4
c	9	8	2	3	3	2	4	4	5	4	3	2
d	9	5	6	1	1	1	1	3	2	1	1	2
e	8	6	6	4	5	7	4	2	4	4	2	0
f	6	6	4	5	3	2	0	2	1	0	0	1
g	10	5	6	8	4	3	5	5	4	7	6	4
h	10	9	9	9	6	7	8	9	8	3	7	8
i	6	4	8	5	6	6	3	3	3	4	5	1
j	10	9	8	7	6	1	0	1	1	1	1	0
Mittelwert	8·6	6·3	5·5	4·8	3·9	3·4	2·8	3·3	3·6	2·9	3·0	2·6

Es muß betont werden, daß bei Erschütterungen in Intervallen von 10, 15 und 20 Sek. nicht alle Individuen, die den Gewöhnungseffekt unzweideutig zeigen, ihre Kontraktionen bei gegebener, konstanter Zahl der Reizungen, gleichmäßig einstellen (wie z. B. in der Tab. I die Exemplare h, i, j — in der Tab. III — a, b, h). Nichtsdestoweniger kommt es aber bei den meisten Individuen zu sukzessiver Einstellung der Reaktionen, wie dies ganz klar und unzweideutig die Durchschnittswerte in den genannten Tabellen erweisen.

Es treten in den drei Tabellen recht starke Abweichungen und Unregelmäßigkeiten auf, weil hier die Reaktionen einzelner Individuen eingetragen wurden, um den Versuchsverlauf ganz genau darzustellen. Für die allgemeine Schlußfolgerung sind jedoch vor allem die sich ergebenden Durchschnittswerte von Bedeutung. Ähnliche Unregelmäßigkeiten im Verhalten der Infusorien werden auch von anderen Autoren verzeichnet, z. B. in der zitierten Arbeit von Day und Bentley über das Lernen bei *Paramecium* (1911, Tab. II, S. 69).

TABELLE IV.  
Erschütterungen nach je 25 Sek.

Exemplar	Ordnungszahlen für je 10 Erschütterungen											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
a	7	5	3	5	6	5	7	8	7	6	10	9
b	7	7	6	7	5	5	9	7	3	5	8	8
c	8	6	1	3	4	2	3	5	3	5	2	6
d	10	4	5	4	4	5	6	4	9	5	10	9
e	9	9	10	9	10	9	9	9	10	10	10	9
f	10	7	9	6	4	6	7	7	6	7	8	10
g	6	5	9	6	5	10	9	7	7	6	7	10
h	9	10	9	9	9	10	10	10	10	9	8	10
i	10	9	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
j	9	7	6	6	9	7	6	10	7	6	5	9
Mittelwert	8·5	6·9	6·8	6·5	6·6	6·9	7·6	7·7	7·2	6·9	7·8	9·0

TABELLE V.  
Erschütterungen nach je 30 Sek.

Exemplar	Ordnungszahlen für je 10 Erschütterungen											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
a	7	8	9	9	10	7	9	7	6	10	9	7
b	10	7	6	7	9	10	9	10	9	9	10	10
c	10	10	10	10	9	10	9	10	7	8	8	10
d	10	10	10	10	10	10	9	10	10	10	10	9
e	10	10	10	10	9	9	9	10	10	9	9	10
f	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	10	10
g	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	8	7
h	10	10	9	10	10	8	10	9	10	10	10	8
i	10	10	10	10	8	8	8	8	9	9	10	8
j	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Mittelwert	9·7	9·5	9·4	9·6	9·5	9·2	9·3	9·4	9·1	9·3	9·4	8·2

Es könnte scheinen, daß das hier aufgeworfene Problem bereits in der in der Zwischenzeit erschienenen Arbeit über *Spirostomum* vollständig gelöst wurde. Doch sind die hier und dort behandelten Fragen zwar nahe verwandt, jedoch nicht identisch; die uns speziell interessierende Abhängigkeit der Gewöhnung vom Reizungsrythmus wurde dort überhaupt nicht berücksichtigt.

TABELLE VI.  
Erschütterungen nach je 60 Sek.

Exemplar	Ordnungszahlen für je 10 Erschütterungen											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
a	7	7	7	9	10	9	7	8	7	7	10	10
b	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
c	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
d	10	10	10	10	10	10	10	10	0	10	10	10
e	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Mittelwert	9·4	9·4	9·4	9·8	10	9·8	9·4	9·6	9·4	9·4	10	10

TABELLE VII.  
Zusammenstellung der Mittelwerte aller vorgenommenen Versuche.

Anzahl d. Exemplare	Frequenz d. Erschüt.	Anzahl d. Erschüt.	Gesamtzahl d. Erschüt. für je 10 Expl.	Gesamtzahl der in der Gruppe eingetretenen Kontraktionen	Unterschied d. Kontraktionenzahl zwischen d. 1 u. 12 Gruppe von je 10 Versuchen
10	10	120	1200	617	50
10	15	120	1200	597	51
10	20	120	1200	507	60
10	25	120	1200	884	-0·5
10	30	120	1200	1116	15
5	60	120	600	578	-0·6

An den weiteren Tabellen fällt die Tatsache auf, daß bei Intervallen von 25 Sek. die Tiere sich an die erlittenen Erschütterungen nicht mehr gewöhnten. Man ersieht dies sowohl aus der Tabelle IV wie aus dem Diagramm (Textig. 2). Eine Ausnahme bildet in dieser Tabelle das unter c verzeichnete Tier. Auch diese Abweichung wurde wahrscheinlich durch besondere Momente individueller Natur, beziehungsweise des physiologischen Zustandes herbeigeführt, wovon weiter unten noch die Rede sein wird. Bei Zeitabständen von 30 Sek. (Tab. V) hat sich kein einziges von den untersuchten Tieren an die Reizung gewöhnt. Fast jede Erschütterung hatte eine Kontraktion zur Folge. Bei Betrachtung der Tabelle VII muß es auffallen, daß die allgemeine Zahl der Kontraktionen in den drei ersten Versuchsserien (mit je 10, 15, 20 Sek.) sukzessive abnimmt anstatt zu steigen. Dieser scheinbar paradoxe Sachverhalt kann durch die Summation der Reize erklärt werden, die bei größerer Frequenz der Reizung von Zeit zu Zeit eintritt. Sie ist die Ursache, daß die Tiere auf häufigere Reize trotz Gewöhnung stärker reagieren<sup>1)</sup>. Sobald sich die Erschütterungen erst jede 20 Sek. wiederholten, blieb die Gewöhnung aus.

Sowohl aus den angeführten Tabellen, wie aus dem Diagramme ist deutlich zu ersehen, daß die Gewöhnung bei Vorticellen von der Häufigkeit der Reize abhängt. Wenn die Reize öfter als je 25 Sek. erfolgen, hören die Tiere bereits nach 13—15 Minuten auf, auf dieselben zu reagieren. Am leichtesten aber gewöhnen sie sich bei einer Zeitspanne von 20 Sek., — diese Frequenz genügt offenbar zur Gewöhnung, andererseits ist sie zu gering, um eine Summation der Reize hervorzurufen. Die Kurve der Einstellung der Reaktion hat einen interessanten Verlauf. Anfangs fällt die Intensität der Reaktionen ziemlich rapid, dann steigt sie, später fällt sie wieder u. s. w., im Ganzen aber nimmt sie ab, wie dies an den drei unteren Kurven zu sehen ist. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen, die W a w r z y ń c z y k bei der Dressur von *Spirostomum* erhielt, wie auch mit den Lernkurven bei höheren Tieren. Ich habe überdies noch Versuche angestellt, in welchen die Frequenz der Reize 60 Sek. betrug. Ich führe

<sup>1)</sup> Die Hypothese einer Reizsummation hat auch D a n i s c h ('21) in etwas anderer Weise aufgestellt.

hier die Daten von nur 5 derartigen Untersuchungen an. Jedes Tier wurde durch 2 Stunden der Beobachtung unterzogen. Ein vergleichender Blick auf den Linienverlauf des Diagramms belehrt, daß die Frequenzlinien bei Intervallen von 30 und 60 Sek. nur wenig verschieden sind. Auch die Tab. V und VI zeigen, daß die Mehrzahl der Individuen sich jedesmal kontrahierte.

Eine ganz genaue Angabe der Grenze der Reizfrequenz, über die hinaus keine Gewöhnung stattfindet, ist schon wegen der bedeutenden individuellen Unterschiede, die auch bei Protozoen unzweifelhaft auftreten, nicht möglich. Zur Darlegung diene ein tabellarischer Ausweis der Kontraktionen bei einigen Paaren von Vorticellen, die unweit voneinander an Wasserpflanzen hafteten und gereizt wurden (Tab. VIII). Man kann sehr oft beobachten, daß unter dem Einfluß derselben Erschütterung das eine Exemplar sich kontrahiert, das andere nicht.

TABELLE VIII.  
Individuelle Unterschiede.

Exemplar	Ordnungszahlen für je 10 Erschütterungen												Frequenz in Sek.
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	
1	10	1	0	4	3	7	4	2	2	3	4	2	15
2	7	4	4	4	2	7	3	3	1	0	4	3	
1	9	8	2	3	3	2	4	5	4	3	7	2	20
2	9	5	6	1	1	1	1	2	1	1	2	2	
1	10	7	9	6	4	6	7	7	6	7	8	10	25
2	6	5	9	6	5	9	9	7	7	6	7	10	
1	10	10	10	10	9	9	9	10	10	9	9	10	30
2	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	10	10	

Besagte Frequenzgrenze, jenseits welcher Anzeichen der Gewöhnung ausbleiben, liegt durchschnittlich zwischen 20 und 25 Sek. Tab. VII und das Diagramm der Mittelwerte liefern dafür die nötigen Belege. Es wurde erwiesen, daß nach einer Reizserie, die zu gänzlicher Einstellung der Kontraktionen führte, das Tier durch mindestens 5 Minuten auf Erschütterungen von gleicher Stärke und bei unverändertem Rythmus nicht reagiert.

### Zur Diskussion.

Bei der graphischen Darstellung sowohl der Mittelwerte als der Sonderbeispiele von Fällen, wo Gewöhnung eingetreten ist, kommt in der stafelförmigen Senkung der Kontraktionskurven eine Periodizität des Vorganges deutlich zum Ausdruck. Einen ähnlichen periodischen Verlauf des Kontraktionsschwundes erwähnt auch Wawrzyńczyk in seiner oberwähnten Arbeit über Gedächtniserscheinungen bei *Spirostomum ambiguum major*, und auch in seinen Diagrammen sind die Verlaufslinien zackig gebrochen (1937, S. 64). Gewisse Zweifel dürfte die Behauptung des Autors erwecken, diese Erscheinung habe keinen Zusammenhang mit der Ermüdung. Nach seiner Überzeugung müßte sich die Ermüdung durch eine Schwächung anderer Tätigkeiten offenbaren, wie etwa der Nahrungsaufnahme, was sich nicht habe feststellen lassen. Es scheint mir, daß wenn das Tier, sowie es hier geschieht, auf einen Reiz mit einer Veränderung seiner Körperlage antwortet, vor allem sein Bewegungsorgan in Anspruch genommen wird und eine Ermüdung erleidet, was die Tätigkeit anderer, am Kontraktionsakt nicht beteiligter Organellen, insbesondere auch die Aktivität der Peristombewimperung oder der pulsierenden Vakuole, nicht störend zu beeinflussen braucht. Jene Ermüdung gibt sich eben durch die Periodizität in der Aufhebung der Stielkontraktionen kund. Als Argument kann die eigene Äußerung des H. Wawrzyńczyk gelten, daß der Verlauf und die Modifikationen der Kontraktionseinstellung bei Protozoen den Erscheinungen entsprechen, die im allgemeinen die Prozesse des Lernens und Vergessens bei höheren Tieren begleiten. Gerade bei sämtlichen höheren Tieren sehen wir, daß unter dem Einfluß einer gewissen sich vollziehenden Tätigkeit lediglich das betreffende Organ ermüdet, wobei die Aktivität anderer Organkomplexe keineswegs gehemmt wird, selbstverständlich insofern eine allgemeine Erschöpfung des Organismus nicht eingetreten ist. Daraus folgt, daß die Aufhebung der Kontraktionen als eine Folge von Gedächtnisvorgängen, ihre Periodizität aber als ein Ermüdungseffekt gedeutet werden können.

Angesichts obiger Folgerungen aus Versuchen mit kontraktile bestielten Vorticellen drängt sich die Frage auf, ob in der ganzen Gruppe sessiler Ciliaten Gewöhnungserscheinungen in der nämlichen Weise verlaufen. Es wäre insbesondere zu ermitteln,

ob die Gewöhnungsgrenze nicht von anatomischen Merkmalen abhängt, davon etwa, ob der Stiel von einem Längsmuskel durchzogen oder steif ist, ob bei kontraktilen Kolonien die Individuen einer Kolonie gesonderte Stielmuskeln besitzen oder ein gemeinsamer Muskel den ganzen Stock durchzieht. Weitere vergleichende Untersuchungen z. B. an *Carchesium* oder an der muskellosen Gattung *Epistylis* wären daher dringend nötig.

Von Wichtigkeit ist jedenfalls die Tatsache, daß eine ausgesprochene Ähnlichkeit im Verlauf gewisser psychophysiologischer Erscheinungen bei systematisch so weit voneinander stehenden Organismen besteht, wie einerseits die Glockentierchen, anderseits Crustaceen oder Säugetiere.

#### Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Vorticellen gewöhnen sich an konstante rythmische Reize.
2. Diese Fähigkeit ist bei ihnen von der Frequenz der aufeinanderfolgenden Reize abhängig. Damit sich ein Glockentierchen an Erschütterungen gewöhne, dürfen die Einzelreize sich weder zu oft noch zu selten wiederholen.
3. Wiederholen sich die Erschütterungen beim eingehaltenen Rythmus seltener als je 20—25 Sek., dann sind an den Versuchstieren keine Gewöhnungssymptome wahrzunehmen.
4. *Vorticella* gewöhnt sich am leichtesten an Einzelreize, die jede 20 Sek. aufeinander folgen. Nach einem derartigen, durch 13—15 Min. fortgesetzten Versuche hört dieses Ciliat auf Erschütterungen durch Kontraktionen zu beantworten.

Es sei mir hier gestattet dem Herrn Prof. Dr. T. Garbowski, unter dessen Leitung und Anregung ich obige Arbeit ausführte, herzlich zu danken, wie auch dem Herrn Doc. Dr. R. Wojtusiak, der mich mit Rat und Tat bereitwilligst unterstützte.

Aus dem Psychogenetischen Institut der Jagellonischen Universität in Kraków.

#### Angeführte Schriften.

1. Blochmann F., Die mikroskopische Tierwelt des Süßwassers. Abt. I. Protozoa. Hamburg 1895. — 2. Bramstedt F., Dressurversuche mit *Paramecium caudatum* und *Stylonychia mytilus*. Marburg 1935. — 3. Bütschli O., Protozoen. Bronn's Klassen und Ordnungen des Tierreichs. Leipzig 1889. — 4. Dahl F., Die Tierwelt Deutschlands. Urtiere oder Pro-

- tozoa I. Jena 1935. — 5. Danisch F., Über die Reizbiologie und Reizempfindlichkeit von *Vorticella nebulifera*. Z. allg. Physiol. 1921, vol. 19. — 6. Day M. und Bentley M., A note on learning in *Paramecium*. The Journ. of. anim. 1911, vol. 1. — 7. Doflein F., Lehrbuch der Protozoenkunde. Jena 1929. — 8. Dembowski J., Über die Nahrungswahl und die sog. Gedächtniserscheinungen bei *Paramecium caudatum*. Trav. Inst. Neneki 1922, vol. I. — 9. Fischel W., Tiere mit Gefühl und Verstand. Berlin-Lichterfelde 1936. — 10. Jennings H. S., Das Verhalten der niederen Organismen unter natürlichen und experimentellen Bedingungen. Berlin 1910. — 11. Joteyko J., Znużenie (Przel. Falkowski J.). Warszawa 1932. — 12. Lang A., Lehrbuch der vergleichenden Anatomie der wirbellosen Tiere. Protozoa. Jena 1901. — 13. Skowron St., Organizm a życie psychiczne. Warszawa 1934. — 14. Soest H., Dressurversuche mit Ciliaten und rhabdocelen Turbellarien. Z. f. vergl. Physiol. vol. 24. 1937. — 15. Wawrzyńczyk St., Untersuchungen über das Gedächtnis von *Spirostomum ambiguum major*. Acta Biol. Exp. vol. 11, 1937.
-

The first part of the paper deals with the general principles of the theory of the function of the brain. It is shown that the function of the brain is to receive and interpret information from the external world. This information is received through the senses and is interpreted by the brain. The brain then sends out instructions to the muscles and glands to carry out the necessary actions. This process is known as the function of the brain.

The second part of the paper deals with the anatomy of the brain. It is shown that the brain is divided into three main parts: the cerebrum, the cerebellum, and the brainstem. The cerebrum is the largest part of the brain and is responsible for the higher functions of the mind, such as thought, memory, and emotion. The cerebellum is a smaller part of the brain and is responsible for the coordination of movement and balance. The brainstem is the part of the brain that connects the cerebrum and cerebellum to the rest of the body. It is responsible for the control of the basic functions of life, such as breathing and heart rate.

The third part of the paper deals with the physiology of the brain. It is shown that the brain is a highly complex organ and is made up of billions of cells. These cells are organized into a network of neurons that communicate with each other. The communication between neurons is done through electrical impulses. The brain also has a blood supply that carries oxygen and nutrients to the cells. The brain is a very sensitive organ and is easily damaged by injury or disease.

The fourth part of the paper deals with the pathology of the brain. It is shown that there are many different diseases that can affect the brain. Some of these diseases are caused by infections, such as meningitis and encephalitis. Other diseases are caused by degeneration of the brain cells, such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Some diseases are caused by trauma, such as a stroke or a head injury. The symptoms of brain disease can vary widely and can be very serious.

The fifth part of the paper deals with the treatment of brain disease. It is shown that there are many different treatments that can be used to treat brain disease. Some treatments are aimed at relieving the symptoms, while others are aimed at slowing down the progression of the disease. Some treatments are aimed at preventing the disease from occurring in the first place. The treatment of brain disease is a complex task and requires a multidisciplinary approach.

*O polichromowych barwieniach przyżyciowych rozmaitych komórek brzuchonogów przy pomocy pyronin. — Über polychrome Vitalfärbungen verschiedener Gastropoden-Zellen mit Pyroninen.*

Mémoire

de M. **LUDWIK MONNÉ**,

présenté le 7 Mars 1938 par M. B. Fuliński m. c.

Ich versuchte Gastropoden-Zellen mit verschiedenen basischen Farbstoffen zu tingieren und stieß dabei auf Akridinrot und Pyronin, mit welchen ich, zu meinem Erstaunen, prachtvolle polychrome Vitalfärbungen erzielte. Beide Farbstoffe stammten von Grübler. Sie wurden den genannten Zellen in isotonischer (0.7—0.8%) Kochsalzlösung zugeführt und ergaben dieselben Resultate. Ich arbeitete an verschiedenen Zellen erwachsener Individuen von *Helix lutescens* und junger Exemplare von *Paludina vivipara*, welche dem Uterus der Muttertiere entnommen wurden. Insbesondere untersuchte ich bei der erstgenannten Art die männlichen Geschlechtszellen, die Nährzellen der Gonade, die Eiweiß-, Speichel- und Fingerdrüsenzellen, die Leydigschen Blasen zellen, die Epithelzellen des *Vas deferens* und der Ausführungsgänge vom *Receptaculum seminis* und von der Speicheldrüse.

Mit Akridinrot und Pyronin färbte sich in diesen Zellen das Vakuom hellgelb, die Mitochondrien dagegen dunkelrot. Unter Vakuom verstehe ich diejenigen Vakuolen, welche sich auch mit Neutralrot färben lassen. Aber auch andere zelluläre Einschlüsse kamen bei einer Färbung mit diesen Farbstoffen gefärbt zum Vorschein. So z. B. färbten sich in vielen Eiweißdrüsenzellen die Parasomen, also ergastoplasmatische Gebilde, herrlich ziegelrot.

In den Leydig'schen Blaszellen färbten sich einige Vakuolen rosarot und andere gelb, ebenso wie gewisse feste Einschlüsse. Auch die Membran dieser Blaszellen färbte sich oft hellgelb. In den Speicheldrüsenzellen färbten sich die Sekretionsgranula in gewissen Stadien gelblich, das Grundzytoplasma rosarot. Manchmal färbten sich in den Muskelzellen die Myofibrillen rosarot. Im Zerebralganglion färbten sich auch gewisse Fasern, wahrscheinlich die Neurogliafasern, schön rötlich. In den Nährzellen der Gonade färbten sich die lipoiden Einschlüsse, welche zur Bildung der bekannten Myelinfiguren neigen, intensiv gelb. In den meisten von mir untersuchten Zellen färbte sich nach längerer Einwirkung der genannten Pyroninfarbstoffe das Grundzytoplasma hellrosa. Die Färbungen sind also überraschend bunt. Es kommen nicht nur rote und gelbe Farben, sondern auch alle möglichen Zwischenstufen vor.

Am genauesten habe ich die männlichen Geschlechtszellen von *Helix lutescens* untersucht. In den Spermatozyten dieser Tiere färbte sich das Vakuom hellgelb und die Mitochondrien tiefrot. Das zwischen den Mitochondrien liegende Plasma färbte sich manchmal hellgelb, während sich das periphere Grundzytoplasma, nach einer längeren Einwirkung des Farbstoffes, eher hellrosatingierte. Es muß mit Nachdruck hervorgehoben werden, daß polychrome Vitalfärbungen nur dann erzielt werden konnten, wenn die Zellen genügenden Luftzutritt hatten. Bei unzureichendem Luftzutritt erschienen zwar rote, aber keine gelben Farben. Werden die Präparate in der Farbstofflösung auf dem Objektträger ungefähr 20 Minuten in einer feuchten Kammer gehalten und erst dann mit einem Deckgläschen zugedeckt, so erhält man die beschriebenen bunten Färbungen; werden die Präparate dagegen gleich nach Anfertigung mit einem Deckgläschen zugedeckt, so erhält man selbst nach langer Einwirkung des Pyronins nur rote, aber niemals bunte Färbungen. Ebenso konnte ich feststellen, daß zuerst die gelben Farben sichtbar werden und erst viel später die roten. Stirbt die Zelle ab, so verschwinden allmählich die gelben Farben und die ganze Zelle färbt sich intensiv rot.

Es war natürlich interessant, die Ursache dieser schönen polychromen Vitalfärbungen ausfindig zu machen. In den Farbstofftabellen von Schulz und Lehmann (1931) sind Pyronin G und Akridinrot unter Nummer 853 und 854 verzeichnet. Beide

Farbstoffe sind chemisch sehr nahe miteinander verwandt. Sie unterscheiden sich nur dadurch, daß Akridinrot zwei Wasserstoffatome an Stelle zweier Methylgruppen von Pyronin hat. Beide Farbstoffe gehören zur Klasse der Xanthenfarbstoffe und zur Gruppe der Pyronine. Akridinrot und Pyronin G sind rot und zeigen eine gelbe Fluoreszenz, wobei das erstere etwas gelblicher ist als das letztere. Beide Farbstoffe kommen als Salze der Akridinrot- beziehungsweise der Pyronin-Base in den Handel.

Noch eingehender unterrichtet uns die Arbeit von Biehringer (1896) über die Eigenschaften der Pyroninfarbstoffe. Die Pyroninbase hat die interessante Eigenschaft, sich mit verschiedenen Farben in verschiedenen Lösungsmitteln zu lösen. So z. B. löst sie sich in Äther mit gelber Farbe ohne Fluoreszenz und in Alkohol mit roter Farbe und gelber Fluoreszenz. Die Pyroninbase geht sehr leicht durch Oxydation in das Xanthonderivat des Pyronins über.

Dieses Xanthonderivat des Pyronins ist gelb und fluoresziert blau oder grün, je nach den Lösungsmitteln. In Wasser löst es sich nur sehr wenig. Biehringer hat festgestellt, daß das im Handel vorkommende Pyronin in der Regel auch sein Xanthonderivat enthält. Man kann also vermuten, daß dieses Pyronin deshalb polychrom färbt, weil es entweder durch das Xanthonderivat oder vielleicht auch durch die Pyroninbase verunreinigt ist. Im letzteren Fall könnte man auch annehmen, daß die Pyroninbase von verschiedenen Komponenten des Protoplasmas mit verschiedenen Farben gelöst oder vielleicht auch von ihnen zum gelben Xanthonderivat oxydiert wird. Um das zu entscheiden, untersuchte ich einige von Grübler gelieferte Pyroninproben.

In einer Eprovette überschichtete ich eine wässrige Pyroninlösung mit Äther und schüttelte die beiden Flüssigkeiten sehr kräftig durcheinander. Nachdem sich die beiden Flüssigkeiten voneinander getrennt hatten, konnte ich mich überzeugen, daß die Ätherschicht vollkommen farblos war. Warf man aber ein Stück Natriumhydroxyd in diese Lösung, so färbte sich die Ätherschicht sofort hellgelb. Das im Handel befindliche Pyronin enthält also nicht die Pyroninbase, sie bildet sich jedoch sofort unter der Einwirkung von Natriumhydroxyd. Der in Äther gelöste gelbe Farbstoff hat alle Eigenschaften der von Biehrin-

ger beschriebenen Pyroninbase. So z. B. färbt sich Filtrierpapier sofort rot, wenn man darauf die gelbe Ätherlösung gießt.

Gießt man dagegen Chloroform in eine wässrige Pyroninlösung und schüttelt die beiden Flüssigkeiten kräftig durcheinander, so färbt sich bald darauf die Chloroformschicht ziemlich stark orange. Diese beiden Fraktionen trennte ich voneinander und reinigte sie sehr sorgfältig; die rote wässrige Lösung mit Chloroform, die orangegelbe Chloroformlösung mit Wasser. Auf diese Weise erhielt ich reines Pyroninsalz in Wasser und den reinen gelben Farbstoff in Chloroform gelöst. Das im Handel befindliche Pyronin enthält also einen gelben Farbstoff, welcher in konzentrierter Lösung orangefarbig ist. Alle von Grübler gelieferten und von mir untersuchten Proben von Pyronin und Akridinrot enthielten diesen gelben Farbstoff, jedoch in ziemlich verschiedenen Mengen. Es muß noch hervorgehoben werden, daß dieser gelbe Farbstoff nicht die Eigenschaften der Pyroninbase aufwies. Dagegen besaß er die Eigenschaften des von Biehringer beschriebenen Xanthoderivats des Pyronins. So z. B. löst er sich in konzentrierter Schwefelsäure mit gelber Farbe und bläulicher Fluoreszenz, wobei diese Farbe beim Verdünnen mit Wasser in grün umschlägt. In Chloroform gelöst fluoresziert dieser Farbstoff bläulich. Er ist stark löslich in Chloroform, in Wasser sehr wenig und in Äther so gut wie gar nicht. Das Pyroninsalz dagegen ist sehr stark löslich in Wasser und sehr schwach in Chloroform. Das Grüblersche Pyronin ist also allem Anschein nach ein Gemisch von Pyronin und seines Xanthoderivats.

Mit diesen beiden voneinander getrennten und gereinigten Farbstoffen versuchte ich nun die männlichen Geschlechtszellen von *Helix lutescens* zu färben. Einen Tropfen der gelben Chloroformlösung brachte ich auf einen Objektträger und einen Tropfen der roten wässrigen Lösung auf einen anderen. Nachdem die beiden Flüssigkeiten verdampft waren, blieben die Farbstoffe in reiner, trockener Form auf den Objektträgern zurück. Ich zerriß nun die Gonaden auf den Farbstoffflecken in einem Tropfen einer 0·8% wässrigen Kochsalzlösung und hielt diese Präparate ungefähr 20 Minuten in einer feuchten Kammer. Es zeigte sich nun, daß in den männlichen Geschlechtszellen nur das Vakuum mit dem gelben, chloroformlöslichen Farbstoff gefärbt werden

konnte. Mit demselben Farbstoff färbten sich in den Nährzellen die zur Bildung von Myelinfiguren stark neigenden, lipoiden Einschlüsse äußerst intensiv gelb. Der gelbe Farbstoff, das Xanthonderivat des Pyronins, scheint also, im Gegensatz zum Pyroninsalz, stark lipoidlöslich zu sein. Mit dem gereinigten Pyronin dagegen konnten in männlichen Geschlechtszellen nur die Mitochondrien intensiv rot gefärbt werden, wobei sie manchmal einen gelblichen Schimmer annahmen, was aber auf die Fluoreszenz des Pyroninsalzes zurückzuführen ist. In den Nährzellen färbten sich mit dem gereinigten Pyronin nur die Mitochondrien, niemals dagegen die erwähnten lipoiden Einschlüsse.

Die schönen polychromen Vitalfärbungen kommen also dadurch zustande, daß das im Handel befindliche Pyronin ein Gemisch von rotem Pyroninsalz und seines gelben Xanthonderivats ist. Nun ist es auch klar, warum zuerst die gelben Farben erscheinen und dann die roten. Der gelbe Farbstoff ist stark lipoidlöslich, dringt infolgedessen zuerst in die Zellen ein und färbt als erster. Das rote Pyronin scheint viel schwächer lipoidlöslich zu sein, passiert infolgedessen viel langsamer die Plasmamembran und färbt deshalb viel später. Das stark wasserlösliche und schwach chloroform- und lipoidlösliche Pyronin färbt die Mitochondrien, während dagegen das schwach wasserlösliche und stark chloroform- und lipoidlösliche Xanthonderivat des Pyronins das Vakuum tingiert.

Ich versuchte auch den männlichen Geschlechtszellen die Leukoform des Pyronins zuzuführen. Durch Hinzufügung von einem Tropfen einer Natriumsulfitlösung ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) wurde Pyronin in einer 0.8% Kochsalzlösung reduziert und infolgedessen entfärbt. Mit der reduzierten Pyroninlösung konnten niemals Färbungen erzielt werden. Die männlichen Geschlechtszellen von *Helix lutescens* waren also nicht imstande die Leukoform des Pyronins zum Farbstoff zu oxydieren, obwohl sie reichlichen Luftzutritt hatten.

Die Pyroninbase erhielt ich auf die oben beschriebene Weise im reinen Zustande, gelöst in Äther, und versuchte damit, nach Verdampfen des Äthers, die männlichen Geschlechtszellen von *Helix* zu färben. Dabei konnte ich aber nur feststellen, daß die Zellen bald abstarben, sich zuerst diffus gelblich und später intensiv rot färbten.

Meinem hochverehrten Chef, dem Herrn Prof. Dr. B. Fuliński danke ich bestens für die Förderung meiner Arbeit. Prof. Dr. W. Leśniański, der mich auf die Arbeit von Biehringer aufmerksam gemacht und mir wertvolle Ratschläge bezüglich der Farbstoffchemie erteilt hat, drücke ich an dieser Stelle meinen besten Dank aus.

Aus dem Zoologischen Institut der Polytechnischen Hochschule in Lwów.

### Literaturverzeichnis.

- 1) Biehringer J., Über Farbstoffe der Pyroningruppe. Journal f. prakt. Chemie, Bd. 54. 1896. — 2) Conn H. J., Biological Stains Geneva N. Y. U. S. A. 1929. — 3) Monné L., Vergleichende Untersuchungen über den Golgi-Apparat und das Vacuom in Soma- und Geschlechts-Zellen einiger Gastropoden. Bull. Acad. Pol. Sc. et Lettr., Cl. Math. Nat., Sér. B. 1930. — 4) Parat M., Contribution à l'étude morphologique et physiologique du cytoplasme. Arch. d'Anat. micr. 24 1928. — 5) Schulz Cr. u. Lehmann L., Farbstofftabellen. Berlin 1931.

*O zawartości witaminy A w ziarnie mozgi kanaryjskiej (Phalaris canariensis). — Sur la teneur en vitamine A de la graine d'Alpiste (Phalaris canariensis).*

Mémoire

de M. **ZB. GŁÓWCZYŃSKI**,

présenté le 7 Mars 1938 par M. F. Rogoziński m. t.

(Planche 3).

Dans un mémoire »Sur la valeur nutritive de la graine d'Alpiste« (1) il a été démontré que dans un régime composé d'alpiste la substitution du beurre à l'huile d'olive, par conséquent d'une graisse riche en vitamine A à une graisse pauvre en ce composant, n'exerçait aucune influence favorable sur la croissance et le poids final de jeunes rats blancs, soumis à ce régime. On pouvait en présumer que l'alpiste lui-même contient la vitamine A en quantité suffisante.

Dans le travail présent nous avons entrepris l'étude de ce problème en employant des poussins comme animaux d'expérience.

Les poussins se prêtent bien, en effet, à ce genre de recherches. Leur besoin de vitamine A est considérable; il dépasse plusieurs fois celui des rats blancs. D'après Moore (2) 4  $\gamma$  environ de carotène par jour suffisent pour couvrir la demande en carotène d'un rat de 100 g; pour les poussins le nombre respectif est de 30  $\gamma$  selon Kline, Schultze et Hart (3). Ces doses s'accordent bien avec les observations de Capper et collaborateurs (4), ainsi qu'avec les données récentes de Ringrose et Norris (5) et de Biely et Chalmers (6).

Grâce à cette haute demande de vitamine A chez les poussins on peut se passer en constituant pour eux des régimes carencés, de la purification scrupuleuse des composants de la ration ayant

pour but l'élimination complète des traces de cette vitamine, soin qui est indispensable dans des expériences analogues sur les rats blancs.

Les données sur l'avitaminose A chez les poussins ne sont pas très nombreuses. Elvehjem et Neu (7) donnent la revue de la bibliographie respective jusqu'en 1932. Ces auteurs discutent en même temps les symptômes caractéristiques de cette carence chez les poussins.

Il est intéressant que la xérophtalmie, trait des plus typiques dans l'avitaminose A des jeunes rats blancs, n'apparaît pas d'une façon constante chez les poussins carencés. On n'observe des lésions d'yeux que dans un certain nombre de cas et ces lésions ne présentent pas le caractère de la xérophtalmie typique.

Les symptômes typiques de la carence sont les suivants: arrêt de la croissance à partir de la 3—4 semaine de l'ingestion du régime carencé, affaiblissement général, raideur des jambes, manque de coordination dans les mouvements et, enfin, des troubles caractéristiques dans le système uropoétique. Les urethères sont dilatés et remplis d'urates, les reins subissent une dégénérescence prononcée et ils assument d'ordinaire une couleur très pâle, par suite d'accumulation d'urates. D'après Elvehjem et Neu cette dégénérescence des reins est liée d'ordinaire à l'augmentation du taux de l'acide urique dans le sang. Ces auteurs ont dosé l'acide urique dans le sang de 32 poussins âgés de 21 à 60 jours. Chez 25 animaux le taux de l'acide ne dépassait pas 12 mg dans 100 cm<sup>3</sup>, avec des limites de 4·8 à 11·8 mg; chez les 7 autres le taux était de 22·5 à 44·4 mg. D'après les dosages des auteurs on trouve chez les poussins normaux 5 mg dans 100 cm<sup>3</sup> de sang. Il y a, selon ces auteurs, une corrélation constante entre le degré de la dégénérescence des reins et la teneur du sang en acide urique; une telle corrélation n'existe pas d'autre part entre le taux de cet acide dans le sang et l'état général des poussins malades. Dans des cas particuliers la teneur du sang en acide urique atteint une hauteur monstrueuse. Ainsi, Sankaran (8) a trouvé chez un poulet 375 mg de cet acide dans le plasma sanguin, la teneur chez l'animal normal de contrôle ne dépassant pas 8·34 mg.

Le régime fondamental dans nos essais était rapproché de celui d'Elvehjem et Neu: il avait la composition suivante: maïs blanc 580, son de blé 250, caséine brute (*caseinum purum* für Ge-

nußzwecke, Merck) 120, chlorure de sodium 10, carbonate de calcium 10, phosphate de calcium tricalcique 10, levure séchée 20. Au lieu de soumettre les poussins à l'irradiation durant 20 minutes trois fois par semaine, comme le faisait Elvehjem, nous avons appliqué une préparation de la vitamine D («Vitavit» de Spiess), contenant 15000 U. I. dans 1 cm<sup>3</sup>. On donnait tous les trois jours une goutte de la préparation par poussin. Dans les régimes à l'alpiste on remplaçait partiellement le maïs blanc par la graine d'alpiste.

### Expérience 1.

L'expérience a été exécutée au printemps, pendant les mois de mai et de juin. On y a soumis 40 poussins d'un jour, Leghorn blancs, d'une couvée artificielle, du poids moyen de 34 g. On les a réparti en 5 groupes, de 8 animaux chacun.

Le groupe I ingérait le régime fondamental d'Elvehjem, où 30% de maïs ont été remplacés par la graine d'alpiste, le groupe II le régime fondamental, supplémenté de l'huile de foie de morue. On donnait cette huile chaque jour individuellement avec une pipette, depuis la seconde semaine de la vie, en commençant par une goutte et en augmentant cette dose avec l'âge jusqu'à 15 gouttes par animal au maximum. Les trois autres groupes ingéraient le régime carencé sans addition quelconque. Chaque groupe était placé dans un compartiment d'une mère artificielle, chauffée à l'électricité. La température initiale était de 30°: on la rabaisait graduellement pendant les trois premières semaines jusqu'à la température ordinaire de chambre. Chaque compartiment était relié avec une cage en panneaux de grillage d'une superficie de 0.2 m carré environ. La chambre où les cages étaient placées donnait au sud. Pour éviter l'éparpillement on donnait la nourriture humectée d'eau; on la présentait quatre fois par jour. On pesait les poussins tous les deux jours, d'abord en groupe, depuis la quatrième semaine individuellement.

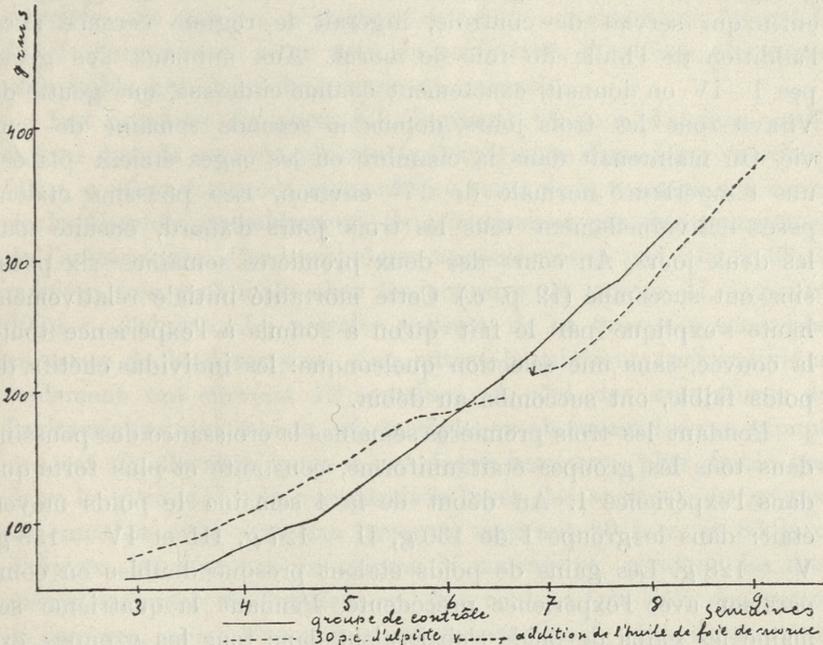
L'expérience a duré 10 semaines. Pendant les trois premières semaines la croissance a été assez faible dans tous les groupes. Au bout de ce temps les poids moyens suivants ont été atteints: groupe I. 71 g, II. 57 g, dans les autres groupes le poids moyen était de 64 g, avec des importantes variations individuelles de 41 g

à 100 g. Au cours de la troisième semaine déjà on a pu constater quelques symptômes pathologiques chez les animaux carencés (groupe III—V). 30 p. c. environ des individus dans ces groupes ont manifesté un arrêt de croissance, et même, dans des cas sporadiques, une perte de poids. En même temps les autres symptômes de la carence ont commencé à se développer; nous en parlerons plus bas, en traitant de l'avitaminose A en général.

Au cours de la quatrième et la cinquième semaine l'accroissement était toujours encore le meilleur chez le groupe I, Fig. 1, pl. 3 (poussin du groupe I—debout; poussin carencé—accroupi), suivait le groupe II, dans les autres groupes les gains de poids s'abaissaient rapidement. Pendant la quatrième semaine les animaux des groupes carencés ont commencé à succomber; la mortalité était la plus forte pendant la cinquième semaine, de manière qu'au bout de ce temps moins de la moitié des poussins carencés est restée vivante; ils accusaient d'ailleurs tous des symptômes d'avitaminose. C'est vers ce temps, au cours de la 5 semaine qu'on a pris parmi les animaux carencés 7 individus; ils ont été mis au régime contenant 30 p. c. d'alpiste, pour voir si ce régime exercerait une action curative. Pendant la 6 semaine les gains de poids dans le groupe I devenaient plus faibles que dans le groupe II; pendant la 7 semaine ils s'abaissaient davantage encore, et les symptômes d'avitaminose apparaissaient. Au cours de cette 7 semaine tous les animaux des groupes carencés ainsi que du groupe soumis à la cure ont succombé. Les poussins du groupe II, recevant l'huile de foie de morue, accusaient un gain de poids constant. Comme la condition des poussins du groupe I empirait toujours, on a commencé vers la fin de la 7 semaine, à donner à la moitié d'entre eux de l'huile de foie de morue. Ce traitement a été suivi d'une amélioration rapide de la condition: le gain de poids a monté rapidement, les symptômes pathologiques ont disparu complètement. Les poussins qui ingéraient le régime à l'alpiste sans addition de l'huile de foie de morue ont succombé tous dans les trois dernières semaines de l'expérience, en accusant des symptômes d'avitaminose très prononcés.

Les résultats de cette expérience peuvent être résumés de la manière suivante: le régime contenant 30 p. c. de la graine d'alpiste accuse sur les poussins une action préventive prononcée. Il

assure un bon accroissement pendant les cinq premières semaines de la vie, en ne le cédant en rien sous ce rapport au régime à l'huile de foie de morue; il prolonge la survie des animaux de 2 à 3 semaines.



Tracé.

Depuis la cinquième semaine d'autre part il commence à devenir insuffisant. Administré vers cette époque, il ne peut plus exercer une action curative sur des poussins atteints d'avitaminose.

## Expérience 2.

Comme l'introduction de l'alpiste dans le régime d'Elvehjem en quantité de 30 p. c. n'a donné dans l'expérience 1 que des résultats partiellement favorables, on a essayé dans l'expérience 2 si l'augmentation de cette graine dans le régime n'exercerait pas une influence plus prononcée sur la croissance et la survie des poussins. L'expérience a été exécutée en automne, depuis le commencement d'octobre jusqu'à mi-décembre. Les poussins d'un jour,

Leghorn blancs comme dans l'expérience 1, provenaient de la même source. 49 animaux (toute une couvée artificielle), du poids moyen de 36 g, ont été répartis en 5 groupes. Le groupe I ingérait 60 p. c. d'alpiste, le groupe II 30 p. c. de cette graine, les groupes III et IV le régime carencé de l'expérience 1, le groupe V enfin qui servait de contrôle, ingérait le régime carencé avec l'addition de l'huile de foie de morue. Aux animaux des groupes I—IV on donnait, exactement comme ci-dessus, une goutte de Vitavit tous les trois jours, depuis la seconde semaine de leur vie. On maintenait dans la chambre où les cages étaient placées une température normale de 17° environ. Les poussins étaient pesés individuellement tous les trois jours d'abord, ensuite tous les deux jours. Au cours des deux premières semaines six poussins ont succombé (12 p. c.). Cette mortalité initiale relativement haute s'explique par le fait qu'on a soumis à l'expérience toute la couvée, sans une sélection quelconque: les individus chétifs, de poids faible, ont succombé au début.

Pendant les trois premières semaines la croissance des poussins dans tous les groupes était uniforme, constante et plus forte que dans l'expérience 1. Au début de la 4 semaine le poids moyen était: dans le groupe I de 130 g, II — 127 g, III et IV — 133 g, V — 128 g. Les gains de poids étaient presque doubles en comparaison avec l'expérience précédente. Pendant la quatrième semaine les gains de poids s'abaissaient dans tous les groupes, excepté le groupe de contrôle (4.5—4.9 g resp. 7.9 g). Vers la fin de cette semaine on a pu observer l'apparition des symptômes de l'avitaminose chez les poussins des groupes carencés (III et IV). Dès la cinquième semaine les animaux de ces groupes commençaient à succomber; la mortalité pendant la 6 semaine était de 30 p. c. du nombre total. Tous les survivants ont accusé depuis la 5 semaine une condition très grave. Ils succombèrent tous au cours de la 9 semaine.

Comme l'état des poussins dans les groupes I et II, ingérant l'alpiste, commençait à devenir insatisfaisant depuis la 4 semaine en comparaison avec le groupe de contrôle, il était à craindre que le régime à 60 p. c. d'alpiste n'exercerait pas une action curative décisive. C'est pourquoi nous nous sommes décidés à appliquer comme régime curatif un régime ne contenant que l'alpiste comme graine unique. Il était composé de: alpiste 83 p. c., ca-

séine 12 p. c., sels minéraux 3 p. c., levure séchée 2 p. c. On y a soumis depuis le commencement de la 6 semaine 7 poussins, pris parmi les deux groupes carencés. Deux individus, dont l'état morbide était évidemment fort avancé, ont succombé dans quelques jours, les autres, bien qu'accusant de temps à autre une forte diarrhée, ont survécu, en gagnant du poids constamment, jusqu'à la fin de l'expérience. Leur gain de poids était, il est vrai, de moitié plus faible que celui du groupe de contrôle.

Les poussins du groupe I, ingérant 60 p. c. d'alpiste, souffraient dans la seconde période de l'expérience d'une forte diarrhée: 50 p. c. d'entre eux ont succombé au cours de la 8 semaine, à cause de la diarrhée probablement; ils n'accusaient pas des symptômes de l'avitaminose. Ces symptômes apparaissaient par contre d'une manière très prononcée chez les poussins du groupe II, ingérant 30 p. c. d'alpiste. Le premier poussin de ce groupe a succombé au cours de la 6 semaine, cinq autres le suivirent, trois individus seulement ont survécu 12 semaines. A côté des symptômes de l'avitaminose, qui étaient ici de règle, on observait dans ce groupe des cas de diarrhée, mais à un degré beaucoup plus faible que dans le groupe I. En comparaison avec les animaux du groupe de contrôle ainsi que des groupes ingérant 60 p. c. et 83 p. c. d'alpiste, les animaux du groupe II accusaient, pendant les dernières semaines de l'expérience, une couleur très pâle des pattes et des becs, indice d'un manque de la vitamine A, resp. de carotène.

En résumant les résultats de l'expérience 2 on peut dire que la survie des poussins soumis au régime carencé d'Elvehem a été au maximum de 9 semaines. Parmi les poussins ingérant l'alpiste à 30 p. c. un tiers environ a survécu 12 semaines. Tous les poussins, tant ceux qui ont succombé que ceux qui ont survécu, un excepté, accusaient des symptômes d'avitaminose A très graves. Chez les poussins ingérant 60 p. c. d'alpiste ces symptômes n'apparaissaient pas; mais les animaux étaient atteints d'une forte diarrhée. L'introduction curative de l'alpiste à 83 p. c. dans le régime d'Elvehem chez les poussins atteints d'avitaminose s'est montrée efficace, à l'exception des animaux pas trop gravement atteints. L'alpiste ingéré en grande quantité causait dans tous les cas une diarrhée obstinée.

Il était intéressant de s'assurer, si les poussins soumis à nos régimes n'étaient pas atteints de rachitisme. Dans le cas d'une

carence double on ne saurait évidemment attribuer les résultats obtenus au manque de la vitamine A exclusivement. Pour résoudre cette question nous avons dosé dans les deux expériences la cendre dans les fémurs et les tibias dégraissés à l'alcool et à l'éther de la plupart des poussins succombés.

Nous avons trouvé pour le régime d'Elvehjem, expérience 1, cendre en p. c.: fémurs 45·8 en moyenne (43·6—49·9); tibias 47·5 (45·1—49·7); expérience 2: fémurs 37·7 (29·3—46·5), tibias 40·8 (34·6—46·2). Régime à 30 p. c. d'alpiste: expérience 1: fémurs 40·3 (37·5—43·8), tibias 44·5 (41·0—48·8); expérience 2: fémurs 38·7 (34·3—45·2), tibias 41·9 (39·2—45·7). Régime à 60 p. c. d'alpiste, expérience 2: fémurs 33·0 (31·1—36·4), tibias 35·9 (34·2—38·3). Groupe de contrôle dans la même expérience: fémurs 43·7, tibias 45·3. Ces chiffres montrent que nos poussins n'étaient pas atteints de rachitisme. La minéralisation un peu faible des os dans le groupe ingérant 60 p. c. d'alpiste pourrait s'expliquer peut être par la diarrhée obstinée dont ces animaux souffraient.

Dans le cas de rachitisme typique chez les poussins à l'âge de 50—60 jours le taux de la cendre est d'après Rogoziński et Głównyński (9) de 26·6 (24·3—29·29) dans les fémurs, de 29·5 (27·46—30·91) dans les tibias. Elvehjem et Kline (10) ont trouvé dans les tibias des poussins rachitiques âgés de 6 semaines 27·7—29·2 p. c. de cendre; chez les animaux de contrôle 40·66—43·02 p. c.

Les symptômes de l'avitaminose A que nous avons eu l'occasion d'observer peuvent être résumés brièvement de la manière suivante: dans les stades initiaux apparaît une raideur des jambes qui empire progressivement. Dans les cas extrêmes les poussins perdent la faculté de marcher et ne se meuvent qu'en rampant. Au début de la maladie ils restent longtemps sans se mouvoir, l'air assoupi (Fig. 2, pl. 3), les ailes légèrement abaissées. A mesure que l'état morbide progresse, il leur arrive de tomber sur le dos pendant les tentatives de marche; après quelques instants ils se relèvent en regagnant l'équilibre. Ils perdent la faculté de gratter, la déglutition devient empêchée, mais l'appétit persiste en général jusqu'aux derniers heures de la vie. On trouve ainsi à l'autopsie des estomacs pour la plupart remplis; ils ne sont vides que dans les cas où la carence était supportée pendant un temps exceptionnellement long.

TABLEAU I.

Expérience 1.

Fémurs.

Nr.	Poids g	Age jours	Fémur frais g	Fémur sec g	Fémur épuisé g	Cendre g	Cendre en p. c. de sub. épuisée
Carence en Vitamine A.							
28	38	25	0.1919	0.0685	0.0670	0.0330	49.2
			0.1959	0.0696	0.0677	0.0338	49.9
31	47	27	0.2090	0.0632	0.0607	0.0264	43.5
			0.2155	0.0649	0.0629	0.0284	45.1
45	57	29	0.2175	0.0732	0.0711	0.0334	46.9
			0.2167	0.0724	0.0722	0.0344	47.7
69	86	45	0.7270	0.2645	0.2590	0.1215	46.9
			0.7075	0.2646	0.2580	0.1216	47.0
40	143	45	0.9340	0.3972	0.3009	0.1311	43.6
			0.9510	0.4117	0.3144	0.1284	40.8
48	88	46	0.7450	0.2510	0.2454	0.1149	46.8
			0.7950	0.2575	0.2502	0.1150	46.0
47	156	48	1.4645	0.5244	0.5111	0.2234	43.7
			1.4480	0.5274	0.5124	0.2269	44.3
Carence en Vitamine A 30 jours, ensuite 30 p. c. d'Alpiste.							
70	95	44	0.5520	0.2001	0.1942	0.0887	45.7
			0.5480	0.1935	0.1882	0.0861	45.7
32	110	45	0.8785	0.3106	0.3032	0.1199	39.3
			0.8730	0.3045	0.2971	0.1213	40.8
64	170	47	0.8620	0.3183	0.3038	0.1477	48.6
			0.8745	0.3116	0.3003	0.1446	48.2
53	86	47	0.6370	0.2099	0.2039	0.0751	36.8
			0.6470	0.2074	0.2025	0.0845	41.7
30 p. c. d'Alpiste.							
65	40	19	0.1540	0.0530	0.0515	0.0223	43.3
			0.1627	0.0544	0.0521	0.0228	43.8
37	142	51	0.7800	0.3081	0.3000	0.1230	41.0
			0.8180	0.3309	0.3230	0.1311	40.6
56	230	60	1.6720	0.5475	0.5354	0.2088	39.0
			1.6310	0.5242	0.5141	0.1928	37.5
61	153	63	1.3310	0.4466	0.4320	0.1739	40.2
			1.2610	0.4206	0.4082	0.1664	40.8
Groupe de contrôle.							
67	46	27	0.2202	0.0887	0.0840	0.0408	48.6
			0.2495	0.0873	0.0825	0.0401	48.6
44	178	49	1.2540	0.5372	0.4644	0.1996	43.0
			1.2550	0.5431	0.4636	0.2047	44.2

TABLEAU II.

Expérience 1.

Tibias.

Nr.	Poids g	Âge jours	Tibia frais g	Tibia sec g	Tibia épuisé g	Cendre g	Cendre en p. c. de sub. épuisée
Carence en Vitamine A.							
28	38	25	0.3031	0.1014	0.1006	0.0471	46.8
			0.3018	0.1043	0.1025	0.0488	47.6
31	47	27	0.2995	0.0922	0.0895	0.0428	47.8
			0.2900	0.0882	0.0866	0.0425	49.1
45	57	29	0.3310	0.1108	0.1090	0.0523	48.0
			0.3255	0.1075	0.1066	0.0530	49.7
69	86	45	0.9280	0.3465	0.3398	0.1628	47.9
			0.8770	0.3357	0.3300	0.1593	48.3
40	143	45	1.2540	0.5413	0.4098	0.1970	48.1
			1.1566	0.5520	0.4231	0.1960	46.3
48	88	46	0.9895	0.3558	0.3490	0.1659	47.5
			0.9270	0.3431	0.3368	0.1623	48.2
47	156	48	1.8210	0.6637	0.6597	0.3000	45.6
			1.8590	0.6720	0.6521	0.2941	45.1
Carence en Vitamine A 30 jours, ensuite 30 p. c. d'Alpiste.							
70	95	44	0.6910	0.2507	0.2447	0.1191	48.7
			0.7070	0.2540	0.2490	0.1219	48.9
32	110	45	1.1170	0.3999	0.3924	0.1821	46.3
			1.1230	0.4112	0.4032	0.1758	43.6
64	170	47	1.1680	0.4419	0.4253	0.2084	49.0
			1.1800	0.4345	0.4210	0.2110	50.1
53	86	47	0.7660	0.2677	0.2627	0.1144	43.6
			0.7770	0.2658	0.2617	0.1203	46.0
30 p. c. l'Alpiste.							
65	40	19	0.2568	0.0878	0.0865	0.0422	48.8
			0.2697	0.0884	0.0865	0.0405	46.8
37	142	51	1.0680	0.4625	0.4508	0.2047	45.4
			1.1020	0.4782	0.4678	0.2104	45.0
56	230	60	2.1940	0.7443	0.7359	0.3013	41.0
			2.2880	0.7780	0.7699	0.3205	42.2
61	153	63	1.6610	0.5736	0.5636	0.2408	42.7
			1.5740	0.5594	0.5500	0.2418	44.0
Groupe de contrôle.							
67	46	27	0.3000	0.1270	0.1230	0.0582	47.3
			0.3372	0.1263	0.1219	0.0583	47.8
44	178	49	1.6050	0.7281	0.6033	0.2783	46.1
			1.6350	0.7423	0.6198	0.2856	46.1

TABLEAU III.

Expérience 2.

Fémurs dextres.

Nr.	Poids g	Âge jours	Fémur frais g	Fémur sec g	Fémur épuisé g	Cendre g	Cendre en p. c. de sub. épuisée
Carence en Vitamine A.							
374	138	39	0·899	0·2984	0·2911	0·1009	34·6
357	190	42	1·293	0·3345	0·3287	0·0964	29·3
368	136	42	1·348	0·4267	0·4152	0·1508	36·3
370	189	50	2·167	0·6937	0·6722	0·3122	46·5
360	215	52	1·740	0·5542	0·5362	0·2218	41·4
349	293	62	2·209	0·6462	0·6360	0·2411	37·9
30 p. c. d'Alpiste.							
62	180	50	2·192	0·6962	0·6617	0·2489	37·6
43	269	60	2·072	0·7147	0·6780	0·2985	44·0
371	267	71	2·416	0·7144	0·7040	0·2521	35·8
31	333	75	2·441	0·7472	0·7322	0·2600	35·5
38	337	78	2·487	0·8422	0·8103	0·2786	34·3
55	470	78	3·721	1·4352	1·3834	0·6111	45·2
60 p. c. d'Alpiste.							
68	143	44	1·686	0·4987	0·4748	0·1574	33·2
54	180	45	1·634	0·4947	0·4832	0·1505	31·2
32	172	45	1·291	0·4107	0·3953	0·1231	31·1
37	230	50	2·702	0·8734	0·8371	0·3044	36·4
Carence en Vitamine A 37 jours, ensuite 83 p. c. d'Alpiste.							
354	178	40	1·406	0·4802	0·4450	0·1644	36·9
359	188	49	1·788	0·5687	0·5357	0·1775	33·1
Groupe de contrôle.							
356	400	44	2·824	1·2755	1·0088	0·4357	43·2
366	276	44	1·810	0·7894	0·6738	0·2959	43·9

La couleur des pattes et des becs qui vers la 7—8 semaine de l'expérience devenait plus foncée chez les poussins de contrôle, était visiblement plus pâle à cette période chez les animaux carencés et chez ceux qui ingéraient 30 p. c. d'alpiste dans leur régime.

Dans l'expérience 1 nous avons pu observer dans les stades plus avancés de la carence des lésions caractéristiques des yeux,

TABLEAU IV.

Expérience 2.

Tibias dextres.

Nr.	Poids g	Âge jours	Tibia frais g	Tibia sec g	Tibia épuisé g	Cendre g	Cendre en p. c. de sub. épuisée
Carence en Vitamine A.							
374	138	39	1.463	0.4994	0.4837	0.1813	37.5
357	190	42	1.402	0.4067	0.4013	0.1388	34.6
368	136	42	2.179	0.7164	0.7046	0.2904	41.2
370	189	50	1.868	0.6584	0.6449	0.2980	46.2
360	215	52	2.356	0.7747	0.7579	0.3284	43.3
349	293	62	3.150	0.9729	0.9661	0.4030	41.7
30 p. c. d'Alpiste.							
62	180	50	2.341	0.7982	0.7741	0.3032	39.2
43	269	60	2.456	0.9682	0.8913	0.4048	45.4
371	267	71	3.198	1.0204	1.0079	0.3957	39.3
31	333	75	4.140	1.2772	1.2572	0.5149	41.0
38	337	78	4.229	1.3870	1.3153	0.5336	40.6
55	470	78	4.944	1.8867	1.8204	0.8325	45.7
60 p. c. d'Alpiste.							
68	143	44	1.950	0.6057	0.5724	0.2028	35.4
54	180	45	2.557	0.7589	0.7366	0.2629	35.7
32	172	45	1.819	0.6122	0.5883	0.2011	34.2
37	230	50	3.032	1.0021	0.9634	0.3690	38.3
Carence en Vitamine A 37 jours, ensuite 83 p. c. d'Alpiste.							
354	178	40	1.797	0.7357	0.6421	0.2539	39.5
359	188	49	2.008	0.7237	0.6833	0.2523	36.9
Groupe de contrôle.							
356	400	44	3.872	1.8147	1.4163	0.6399	45.2
366	276	44	2.517	1.1662	0.9377	0.4255	45.4

chez les poussins carencés d'abord, puis, une semaine plus tard, chez les poussins qui ingéraient 30 p. c. d'alpiste. Les symptômes étaient: conjonctivite, photophobie, lacrimation intense, enflure du tissu subconjonctival et des paupières. L'exsudation assumait graduellement un caractère visqueux et purulent. Sur l'épithélium de la cornée apparaissaient des érosions, suivies des infiltrations et des ulcérations. L'addition de l'huile de foie de morue exerçait

une action curative très prononcée: une faible cicatrice sur la cornée était le seul indice de la maladie guérie.

Dans l'expérience 2 l'ophtalmie n'a apparu que chez un poussin du groupe ingérant l'alpiste à 30 p. c. dans la neuvième semaine de la vie; elle a été suivie d'une guérison spontanée. On voit donc que l'ophtalmie ne saurait être considérée comme un symptôme constant dans l'avitaminose A des poussins.

L'affaiblissement de la croissance apparaissait dans nos expériences chez les poussins carencés dès la quatrième semaine. Dans la moitié de cas les gains de poids devenaient de plus en plus faibles, ils étaient suivis dans 2—4 derniers jours de la vie d'une forte perte de poids. Dans l'autre moitié de cas on observait des périodes d'arrêt total de la croissance. Ces périodes duraient depuis une semaine jusqu'à 24 jours au maximum.

Chez tous les poussins qui ont succombé dans les stades un peu avancés de la carence on a pu constater, sans nulle exception, des lésions très graves du système uropoétique. Les urethères qui sont à peu près imperceptibles à l'oeil chez l'animal normal étaient énormément dilatés et se présentaient sous forme d'épais cordons blancs; leur diamètre atteignait dans les cas extrêmes 4—6 mm (Figures 3 et 4, pl. 3). Ils étaient remplis d'une masse blanche pateuse qui donnait une réaction de la murexide très prononcée: sous le microscope elle était composée de cristaux sphéroïdaux. La surface des reins était recouverte dans de nombreux cas d'un dépôt blanchâtre; les reins avaient d'ordinaire une couleur pâle; dans quelques cas exceptionnels leur couleur était au contraire foncée, le tissu partiellement détruit. Outre ces symptômes dans les reins on a pu observer dans quelques cas à la fin de l'expérience un dépôt blanc sur le pericarde.

### Conclusions.

Les principaux résultats de nos expériences peuvent être résumés de la manière suivante.

Pour préserver les poussins de l'avitaminose A la graine d'alpiste doit entrer dans le régime en proportion de 30 à 60 p. c. Un régime pareil n'est cependant pas indifférent pour les animaux; il peut facilement provoquer une diarrhée obstinée.

Les symptômes les plus caractéristiques de l'avitaminose A étaient, outre l'arrêt de la croissance, les lésions du système uropoétique: dégénérescence des reins, dilatation, souvent énorme, des uretères, remplis d'urates.

Institut de Physiologie et d'Alimentation Animale à l'Université Jagellonne.

### Bibliographie.

- 1) Rogoziński F. et Głównyński Z., Sur la valeur nutritive de la graine d'Alpiste (*Phalaris canariensis*). Bull. de l'Acad. Polon. d. Sc. et d. L. Série B. 1935. p. 111. — 2) Moore T., Vitamin A and Carotene. Bioch. J. **24**. 1930. p. 692. — 3) Kline O. L., Schultze M. O. and Hart E. B., Carotene and Xanthophyll as sources of Vitamin A for the growing chick. J. of Biolog. Ch. **97**. 1932. p. 83. — 4) Capper N. S., Wilson J. M. Mc. Kibbin and Prentice J. H., The conversion of Carotene into Vitamin A by fowl. Bioch. J. **25**. 1931. p. 265. — 5) Ringrose R. C. and Norris L. C., A study of the Vitamin A requirement of the chick during early life. Poultry Sc. **15**. 1936. p. 390 (d'après Nutrition Abstracts and Reviews. **6**. 1936. p. 618). — 6) Biely J. and Chalmers W., Vitamin A requirements of growing chicks. Canad. J. Res. (D). **14**. 1936. p. 21 (d'après Nutrition Abstracts and Reviews. **6**. 1936. p. 52). — 7) Elvehjem C. A. and Neu V. F., Studies in Vitamin A avitaminosis in the chick. J. of Biolog. Ch. **97**. 1932 p. 71. — 8) Sankaran G. Uric acid crystals in the blood plasma of a fowl suffering from pyonephrosis consequent on Vitamin A deficiency. Current Sc. **4**. 1935. p. 314 (d'après Nutrition Abstr. and Rev. **6**. 1936. p. 149). — 9) Rogoziński F. et Głównyński Z. Sur le rachitisme expérimental V. Le rachitisme et l'infirmité des jambes chez les poussins. Bull. de l'Acad. Polon. d. Sc. et d. L. Série B. 1932. p. 369. — 10) Elvehjem C. A. and Kline B. E., Calcium and phosphorus studies in the chick. J. of Biolog. Ch. **103**. 1933. p. 733.



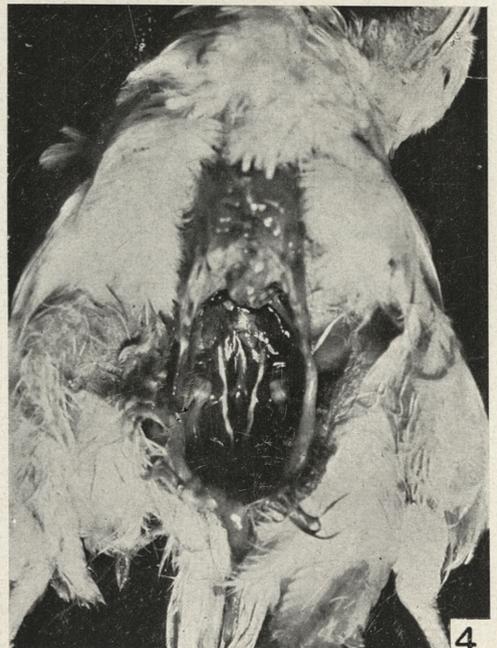
1



2



3



4



BULLETIN INTERNATIONAL  
DE L'ACADÉMIE POLONAISE DES SCIENCES  
ET DES LETTRES  
CLASSE DES SCIENCES MATHÉMATIQUES ET NATURELLES  
SÉRIE B: SCIENCES NATURELLES

DERNIERS MÉMOIRES PARUS.

N° 6—7 B I, 1937.

- Fröhlich E.** Systematische Studien über polnische Eßlöffel (*Cochlearia* L.) unter Berücksichtigung der verwandten europäischen Arten.
- Korzeniewski L.** Etudes biométriques sur la variation des graines de l'Arole.
- Niklewski B. and Wolnicka J.** On the Morphological Phenomena of Roots Chemotropically Excited.

N° 8—10 B I, 1937.

- Horvat I., Pawłowski B. und Walas J.** Phytosozioologische Studien über die Hochgebirgsvegetation der Rila Planina in Bulgarien (Planches 6—7).
- Wojeiechowski J. et Skrobińska J.** L'influence de la concentration des ions d'hydrogène sur le chimiotropisme produit par les phosphates.

N° 8—10 B II, 1937.

- Ackermann J.** Über die Innervierung der Giftdrüsen der Kröte *Bufo bufo* (Planche 16).
- Friedberg W.** Versuche einer Stratigraphie des Miozäns von Polen auf Grund seiner Molluskenfauna. I. Teil.
- Gajewska H.** Über den mikroskopischen Bau des Mitteldarms von *Mesidothea entomon* L. (Planche 20).
- Pautsch F.** Untersuchungen an mit umgekehrter dorsoventraler und kephalo-kaudaler Achse autoplastisch transplantierten Schwänzen von Larven des Grasfrosches (*Rana temporaria*) (Planches 18—19).
- Zaéwilichowski J.** Mitteilung über die  $F_2$ -Generation des künstlich melanierten Schwammspinners *Lymantria dispar* L. (Planche 17).



# TABLE DES MATIÈRES.

Janvier—Mars 1938.

	Page
J. ACKERMANN. Experimentelle histo-chemische Untersuchungen über den Lecithinstoffwechsel im Tierkörper. II. Teil. Über den Einfluß der Lecithinverfütterung auf den Lipidgehalt der Leber (Planche 1) . . . . .	1
J. S. MIKULSKI. Experimental studies in thermal ecology of developing eggs of some amphibians ( <i>Rana</i> , <i>Bufo</i> , <i>Pelobates</i> ) . . . . .	23
S. SKOWRON und Z. WICIŃSKI. Über die Lebensdauer der gelben Körper und die sie beeinflussenden Faktoren	47
Z. GRODZIŃSKI and J. MARCHLEWSKI. The Influence of the Serum upon the Motility of Spermatozoa of the Domestic Cock	55
M. HANS und Z. TABENCKA. Über die Blutgefäße der Haut von <i>Myxine glutinosa</i> L. . . . .	69
H. SZARSKI. Corpus lymphaticum subdermale in the frogs: <i>Rana esculenta</i> , <i>R. temporaria</i> and <i>R. terrestris</i> (Planche 2) .	79
R. SKROCHOWSKA. Über die Abhängigkeit der Gewöhnung bei Vorticellen von der Frequenz wiederholter Reize . .	89
L. MONNÉ. Über polychrome Vitalfärbungen verschiedener Gastropoden-Zellen mit Pyroninen . . . . .	109
ZB. GŁÓWCZYŃSKI. Sur la teneur en vitamine A de la graine d'Alpiste ( <i>Phalaris canariensis</i> ) (Planche 3) . . . . .	115

Le »Bulletin International« de l'Académie Polonaise des Sciences et des Lettres (Classe des Sciences Mathématiques et Naturelles) paraît en deux séries. La première (A) est consacrée aux travaux sur les Mathématiques, l'Astronomie, la Physique, la Chimie, la Minéralogie, la Géologie etc. La seconde série (B) se divise en deux sous-séries; l'une d'elles »I« contient les mémoires qui se rapportent aux diverses branches de la Botanique (la Systématique, l'Anatomie et la Physiologie des Plantes), l'autre »II« est réservée aux publications qui concernent le vaste domaine des recherches morphologiques et physiologiques sur l'homme et les animaux (Anatomie, Biologie générale, Embryologie, Histologie, Physiologie, Psychologie, Zoologie systématique et expérimentale).

Depuis 1928, le »Bulletin International« ne contient que les communications dont l'étendue ne dépasse pas une limite strictement définie; les mémoires de plus vaste envergure sont réunis en un Recueil différent, les »Mémoires« de l'Académie Polonaise des Sciences et des Lettres (Classe des Sciences Mathématiques et Naturelles). Les Mémoires sont également publiés en deux séries: A et B. Chaque mémoire publié dans les Mémoires se vend séparément.

Les abonnements relatifs au »Bulletin International« sont annuels et partent de Janvier. Les livraisons de ce Recueil se vendent aussi séparément.

Adresser les demandes à l'Académie ou à la Librairie »Gebethner et Wolff«  
Rynek Gł., Cracovie (Pologne).